



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생 활 과 학 석 사 학 위 논 문

장내 세균 및 Caco-2 세포에 의한
부티릴 프락토올리고당의 이용과
부티릴 프락토올리고당이
장내 세균 및 Caco-2 세포의
생장에 미치는 영향

Utilization of Butyryl-fructooligosaccharides by
Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells and
The Effects of Butyryl-fructooligosaccharides on
the Growth of Intestinal Bacteria
and Caco-2 Cells

2018년 2월

서 울 대 학 교 대 학 원

식 품 영 양 학 과

엄 민 희

국문초록

프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 장내 미생물인 비피도박테리아와 락토바실러스의 성장을 자극하여 장내 균총을 개선할 수 있기 때문에 건강 기능성 원료로 사용되고 있다. 부티르산(butyric acid)은 대장 상피 세포의 주요 에너지원으로 장점막의 장벽기능 개선 효과와 항염증 효과에 대한 연구가 보고된 바 있다. 최근, FOS와 부티르산을 합성한 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)이 만들어졌다. 본 연구에서는 B-FOS가 장내 세균 및 Caco-2 세포 각각에 의해 분해되거나 이용되는지를 알아보고 B-FOS가 장내 세균 및 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 위하여, B-FOS를 탄소원이 없는 배양 배지에 첨가하여 장내 세균과 Caco-2 세포를 각각 배양하였다. B-FOS의 이용은 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 통해 확인 하였다. 또한, 인산 완충 용액(phosphate buffer saline, PBS)을 첨가한 대조군과 나트륨 부티레이트(NaB)를 첨가한 군, FOS를 첨가한 군을 B-FOS를 첨가한 군과 비교하여 장내 세균과 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다. 더불어, Caco-2 세포 단층의 전기저항 값 측정과 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8) 양을 측정함으로써 B-FOS가 장 상피세포의 장벽기능 및 항염증반응에 미치는 영향을 분석하였다. 실험 결과, B-FOS는 다수의 비피도박테리아와 일부 젖산균의 성장을 유의적으로 증가시켰고, 다수의 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 특히, B-FOS가 첨가되었을 때 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 약 1.8 배 증가했던 *Bifidobacterium longum* BORI의 배양 상등액에서 B-FOS가 소모되었음을 확인 하였다. 또한, *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B.*

catenulatum KCTC 3221에서 B-FOS의 대사산물로 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid), 부티르산이 검출되었다. 이는 B-FOS가 탄소원으로써 유익균에 의해 잘 이용될 수 있음을 의미한다. 더불어, B-FOS는 Caco-2 세포의 증식을 유의적으로 증가시켰고 FOS로 전환되었다. 특히 포도당과 피루브산이 없는 배지에서 약 1.7 배 세포의 증식을 증가시켰다. 한편, Caco-2 세포 단층의 전기 저항값과 LPS로 자극된 HT-29 세포의 IL-8 생성량은 B-FOS를 처리한 군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었다. B-FOS가 장내 세균과 Caco-2 세포 각각의 배양 상등액, 세포체, 세포 파쇄액과 직접 반응했을 때, 균은 균체의 세포벽과 세포 내에서, Caco-2 세포는 세포벽, 세포 내, 외에서 B-FOS를 분해하여 FOS와 부티르산을 생성함을 확인할 수 있었다. 하지만, B-FOS를 함유한 배지에 장내 세균을 배양 했을 때 FOS는 확인되지 않았으며, Caco-2 세포를 배양했을 때 부티르산은 확인되지 않았다. 이를 통해 FOS는 장내 세균에 의해, 부티르산은 Caco-2 세포에 의해 이용되었음을 유추할 수 있었다. 이는 B-FOS가 장내 세균의 성장과 Caco-2 세포의 증식을 촉진하는 데 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 이와 같은 결과에 근거했을 때, 본 연구는 B-FOS가 대장 내에 도달한다면, 장 내강에 서식하는 균과 장 상피 세포에 의해 분해되어 FOS와 부티르산으로 전환된 후 유익균의 성장을 촉진함으로써 장내 미생물 군집의 조절에 대한 역할을 할 수 있으며 장 상피세포의 에너지원으로써 이용되어 대장의 생리적 기능에 기여 할 수 있다는 가능성을 제시한다.

주요어: 프락토올리고당(Fructo-oligosaccharides), 부티르산(butyric acid), 장 상피 세포, 장내 미생물 성장, 부티릴 프락토올리고당(Butyryl-fructooligosaccharides)

학번: 2016-21667

목차

국문초록	i
목차	iii
그림목차	vi
표목차	vii
약어요약	viii
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1 재료	4
2.1.1 부티릴 프락토올리고당 (butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 출처	4
2.1.2 박테리아 균주와 배양 조건	4
2.1.3 세포 배양	6
2.1.4 화학 물질 및 시약	6
2.2 B-FOS의 정제 및 준비	6
2.3 산성 및 열처리 조건에서 B-FOS의 변화	7
2.4 B-FOS가 장내 미생물 생장에 미치는 영향	7
2.4.1 실험 배지 제조	7
2.4.2 미생물의 생장곡선 측정	8
2.5 박층크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 통한 장내 균의 B-FOS 이용 확인	8
2.5.1 균 배양액의 TLC 및 HPLC	8
2.5.2 B-FOS와 균 배양액, 균체, 균체 파쇄액의 반응	11

2.6 B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향	1 1
2.6.1 실험 배지 제조	1 1
2.6.2 Trypan blue 색소 배제법 (dye exclusion assay)을 통한 Caco-2 세포의 수 측정	1 2
2.7 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해 여부	1 2
2.7.1 Caco2 세포 배양액의 TLC 및 HPLC	1 2
2.7.2 B-FOS와 세포 배양액, 세포, 세포 파쇄액의 반응	1 2
2.8 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석에 의한 세포 생존율 측정	1 3
2.9 전기 저항값(Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER) 측정	1 3
2.10 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 처리한 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량 측정	1 4
2.11 위장 상피세포주인 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부	1 4
3. 통계처리	1 5
4. 결과	1 6
4.1 부티릴 프락토올리고당(butryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 정제 결과	1 6
4.2 산과 열처리에서 B-FOS의 안정성	1 6
4.3 나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), FOS, B-FOS, 포도당이 장내 세균의 생장에 미치는 영향	1 9
4.4 장내 균의 B-FOS 이용 및 분해	2 7
4.4.1 배지의 탄소원 종류에 따른 균 배양 상등액 분석	2 7
4.4.2 B-FOS와 균 배양 상등액, 균체, 균체 파쇄액의 반응 결과	3 0
4.5. 배지 구성에 따른 Caco-2 세포 생장의 변화.....	3 3

4.6 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해	3 5
4.6.1 Caco-2 세포 배양 상등액의 TLC 및 HPLC.....	3 5
4.6.2 B-FOS와 Caco-2 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액 의 반응 결과.....	3 5
4.7 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석	3 8
4.8 전기 저항값(Trans-epithelial electrical resistance, TEER) 측정	4 0
4.9 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량	4 2
4.10 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부 확인	4 4
5. 고찰	4 6
6. 요약 및 결론	5 3
7. 참고문헌	5 5
Abstract	6 2

그림목차

Fig. 1. Determination of butyryl-fructooligosaccharides during purification by TLC.....	1 7
Fig. 2. Assessment of stability of B-FOS by TLC.....	1 8
Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients	2 1
Fig. 4. Growth curve of lactic acid bacterial strains in media containing different ingredients	2 3
Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients	2 4
Fig. 6. TLC analysis of culture supernatants of <i>B. longum</i> BORI and <i>E. faecalis</i> cultured in medium with different carbon source	2 8
Fig. 7. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by bacteria	3 1
Fig. 8. Change in the number of Caco-2 cells depending on the presence of glucose and pyruvate.....	3 4
Fig. 9. TLC analysis of the culture supernatants of Caco-2 cells cultured for 4 days in media with FOS and B-FOS.....	3 6
Fig. 10. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by Caco-2 cells.....	3 7
Fig. 11. MTT assays of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS.....	3 9
Fig. 12. TEER values of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS.....	4 1
Fig. 13. The production of IL-8 from HT-29 cells cultured in media containing 0.1%(w/v) NaB, FOS, and B-FOS	4 3
Fig. 14. TLC analysis of the culture supernatant of AGS cells cultured in media containing FOS and B-FOS	4 5

표목차

Table 1. List of the experimental bacterial strains.....	5
Table 2. Conditions of HPLC for analysis of lactic acid, acetic acid, and butyric acid.....	1 0
Table 3. Maximum growth(OD ₆₀₀ nm) of bacteria cultured in media containing different ingredients at 37℃ under anaerobic conditions.....	2 6
Table 4. Detection of organic acids in culture supernatants of bacteria cultured in media containing different ingredients.....	2 9
Table 5. Detection of butyric acid by HPLC after the reaction of B- FOS with cell suspensions, culture supernatant, and cell extracts	3 2

약어 요약

B-FOS; Butyryl-fructooligosaccharides

FOS; Fructo-oligosaccharides

NaB; Sodium butyrate

Glu; Glucose

DI water; Deionized water

LAB; Lactic acid bacteria

BHIB; Brain-heart infusion broth

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

TLC; Thin-layer chromatography

HPLC; High performance liquid chromatography

SCFA; Short chain fatty acids

TEER; Trans-epithelial electrical resistance

IL-8; Interleukin-8

1. 서론

사람의 위장(gastrointestinal track, GI) 내에는 수많은 미생물이 군집을 이루어 서식하고 있으며 이와 같은 집단을 장내미생물무리(enteric microbiota)라고 한다 [1]. 이들은 장관 내부의 생태계를 구성하면서 면역 기능, 소화 및 신진대사에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에 정상적인 위장의 생리와 기능에 필수적이다 [2]. 사람의 장내미생물무리는 환경 변화에 상당히 저항적이지만 항생제, 스트레스, 식이 혹은 특정 질병 등과 같은 요인은 장내미생물무리의 변화를 초래한다 [3]. 장내미생물무리의 구성과 기능의 변화를 디스바이오시스(dysbiosis)라고 하며 가장 일반적인 정의는 비피도박테리아, 락토바실러스와 같은 유익균과 *Escherichia coli*와 같은 유해균의 불균형을 말한다 [4, 5]. 이러한 불균형은 자가 면역 질환, 염증성 장 질환, 비만 등과 같은 다양한 질병들과 직간접적으로 연관되어 있다고 알려져 있다 [6].

프로바이오틱스(probiotics)는 사람의 장내미생물무리의 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다 [7]. 이들은 단쇄 지방산(short chain fatty acids, SCFA)의 생산에 의한 장내 pH 감소 및 장내 영양소와 장벽 부착 부위에 대한 경쟁을 통해 유해균의 성장을 저해한다 [8]. 또한, 면역 활성화 작용, 유당불내증의 경감 등 인체에 유익한 기능을 한다고 알려져 있다 [9]. 프로바이오틱스로 사용되고 있는 대표적인 미생물로는 비피도박테리아와 젖산균(lactic acid bacteria, LAB)에 속하는 균이 있다 [10]. 젖산균은 탄수화물을 발효시켜 젖산을 생성하는 균으로 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*과 같은 속이 포함된다 [11]. 한편, 비피도박테리아는 다양한 올리고당을 에너지원으로써 이용하는 균이며 육탄당을 젖산이나 초산으로 바꾸는 과정에서 과당-6-인산포스포케톨라아제(fructose-6-phosphate phosphoketolase)라는 효소가 작용하고 발효 과정에서 기체를 생성하지 않는다는 독특한 특징을 가지고 있다 [12]. *Actinobacteria* 강 *Actinobacteria* 목에 속하는 비피도박테리

움(*Bifidobacterium*)의 계통 분류 차이를 고려하여 본 연구에서는 젖산균(LAB)과 비피도박테리아를 구분하였다 [13].

프리바이오틱스는 사람에 의해 소화되지 않으며 장내 미생물에 의해 선택적으로 발효되어 이들의 성장과 대사 변화를 조절함으로써 숙주의 건강에 도움을 주는 물질을 의미한다 [10]. 그중 하나인 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 설탕에 과당분자가 β -1, 2로 결합한 형태의 올리고당이다 [14]. FOS는 락토바실러스와 비피도박테리아에 의해 발효가 가능하며 FOS의 섭취는 비피도박테리움과 락토바실러스 종들을 증가시킨다고 알려져 있다 [15-18]. 동물 실험에서는 쥐가 2 주, 8 주, 27 주 동안 저섬유질의 음식을 섭취하였을 때 보다 같은 식이에 9%의 FOS를 포함한 음식을 섭취하였을 때 락토바실러스가 증가했다고 보고된 바 있다 [19]. 또한, 임상 시험에서는 건강한 사람에게 매일 5 g의 FOS를 섭취하게 했을 때 비피도박테리아가 증가한 결과를 보였다 [20]. 하지만, FOS는 *Clostridium butyricum*, *Enterobacter cloacae* 및 병원성 *Escherichia coli* 균주 등 다른 장내 미생물 및 유해균에 의해서도 대사될 수 있음이 밝혀졌다 [13, 21, 22]. 또한, FOS의 섭취가 쥐에서 *Salmonella*의 전좌(translocation)를 증가시키며 특정한 경우에 FOS가 숙주에게 악영향을 줄 수 있다는 연구 결과가 보고 된 바 있다 [23]. 이러한 선행연구의 결과들에 의하면 FOS는 장내 프로바이오틱스 균주를 증가시켜 사람에게 유익한 작용을 할 수 있지만, 장내 FOS의 대사가 가능한 유해균 및 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)에 의해 역효과가 나타날 수도 있음을 알 수 있다.

한편, 장내 미생물의 발효 산물 중 하나인 부티르산은 단쇄지방산에 속하며 장 내에서 대장세포의 증식과 세포사멸, 위장관의 운동성(motility) 및 장내미생물무리의 구성에 중요한 조절자로서 역할을 한다고 알려져 있다 [24]. 하지만, 부티르산은 불쾌한 냄새 때문에 다른 지방산에 비해 향균작용의 관점에서는 관심을 덜 받아왔다. 선행 연구에 의하면 부티르산은 pH

가 4.5와 5인 환경에서 *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* 등 미생물의 성장을 저해하거나 완전히 저지한다고 보고되었다 [25]. 이와 함께, 부티르산은 대장 상피세포의 주요 에너지원으로써 사용되며 장 상피세포의 투과성을 감소시키고 치밀이음부(tight junction) 단백질, 뮤신(mucin) 등의 생성을 자극하여 외부로부터 침입하는 항원에 대한 장벽 기능을 향상시킨다 [14, 26, 27]. 더불어 면역반응과 관련된 사이토카인(cytokine) 분비를 조절하는 항염증 기능에 관여한다고 보고된 바 있다 [6]. 이뿐만 아니라, 부티르산은 대장에서 중요한 음이온으로서도 작용하여 전해질의 흡수 조절을 통해 설사성 장애를 예방할 수 있으며 과민성 대장 증후군 및 염증성 장 질환에 치료 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 [24, 28]. 하지만 선행 연구에 의하면 섭취를 통한 단쇄지방산은 장쇄지방산(long chain fatty acids)과 달리 물에 대해 높은 용해도를 가지고 있어 소화관의 상부에서 확산과 능동수송을 통해 빠르게 흡수되기 때문에 대장에서의 긍정적 효과를 보기 어렵다고 알려져 있다 [29]. 이에 따라 부티르산은 섭취했을 때보다 관장했을 때 염증성 장 질환에서 유의적인 개선 효과가 나타난 것으로 보고되었다 [30, 31]. 하지만, 자극적인 냄새를 가지고 있는 순수한 부티르산의 임상적인 유용성은 여전히 한계점을 가지고 있어 부티르산을 캡슐화 또는 에스테르화된 전구체(tributylin) 등 다양한 형태로 제조하여 동물 및 사람에게 적용하려는 연구가 시도되고 있다 [32, 33].

최근, 이러한 FOS와 부티르산을 합성한 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)이라는 신규 물질이 만들어졌다. B-FOS는 FOS와 부티르산 각각의 단점을 보완하여 장 내에서 다양한 역할을 할 것이라고 기대된다. 하지만, B-FOS의 작용에 대하여 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 B-FOS에 대한 첫 번째 연구로서 장내 세균과 장 상피세포에 의한 B-FOS의 이용을 확인하고 B-FOS가 장내 세균 및 장 상피세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 출처

B-FOS는 (주)비피도(Hongcheon, Korea)에서 제조된 것을 공급받았다.

2.1.2 박테리아 균주와 배양 조건

본 연구에서 사용된 박테리아 균주는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 서울대학교 식품 미생물 연구실로부터 제공되었다. 비피도박테리아 8 개 균주와 젖산균인 락토바실러스 균주 4 개, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 2013, *Streptococcus thermophilus* KCTC 3779는 0.05% (w/v)의 L-cysteine · HCl이 첨가된 de-Mann-Rogosa-Sharpe broth(MRS) (Difco, Detroit, USA) 에서 37℃, 18 시간 마다 2 회 계대배양 후 사용하였다. 그 외 균주는 brain-heart infusion broth(BHIB) (Difco)에서 같은 배양 조건으로 계대배양 후 사용하였다.

Table 1. List of the experimental bacterial strains

Test strains	Abbreviation
Bifidobacteria	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	<i>B. bifidum</i> BGN4
<i>B. longum</i> BORI	<i>B. longum</i> BORI
<i>B. catenulatum</i> KCTC 3221	<i>B. catenulatum</i>
<i>B. animalis</i> KCTC 3219	<i>B. animalis</i>
<i>B. adolescentis</i> KCTC 3216	<i>B. adolescentis</i>
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> RD47	<i>B. longum</i> RD47
<i>B. longum</i> RD72	<i>B. longum</i> RD72
<i>B. thermophilum</i> KCCM 12097	<i>B. thermophilum</i>
Lactic acid bacteria	
<i>Lactobacillus casei</i> KFRI 699	<i>L. casei</i>
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3168	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. plantarum</i> KFRI 708	<i>L. plantarum</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KCTC 3635	<i>L. bulgaricus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 2013	<i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 3779	<i>S. thermophilus</i>
Non-probiotic bacteria	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 10115	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ACTC 6358	<i>S. aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	<i>E. coli</i>
<i>Clostridium butyricum</i> KCTC 1871	<i>C. butyricum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3511	<i>E. faecalis</i>
<i>Prevotella intermedia</i> KCTC 5694	<i>P. intermedia</i>
<i>Clostridium ramosum</i> KCTC 3323	<i>C. ramosum</i>
<i>Escherichia coli</i> DH 5 α	<i>E. coli</i> DH 5 α
<i>Clostridium perfringens</i> KCTC 3269	<i>C. perfringens</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> KCTC 5015	<i>Bac. Thetaiotaomicron</i>

2.1.3 세포 배양

모든 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 사람의 대장암 세포주인 Caco-2(KCLB 30037.1) 세포와 HT-29(KCLB 30038) 세포는 10% (v/v) 우태아 혈청과 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 4.5 g/L 포도당)에서 37℃, 5% CO₂ 환경을 유지하며 5% CO₂ 세포배양기(MCO-18AIC, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 배양되었다. 인체 위암 세포주인 AGS 세포(KCLB 21739)는 RPMI-1640(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 Caco-2 세포와 같은 조건으로 배양하였다.

2.1.4 화학 물질 및 시약

모든 화학물질 및 시약은 시그마 알드리치(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 아닌 경우에는 구체적으로 명시하였다.

2.2 B-FOS의 정제 및 준비

B-FOS의 정제는 흡착제인 Diaion HP20(Mitsubishi, Tokyo, Japan)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 50 × 5 cm의 Glass Econo-Column(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 정량의 Diaion HP20을 충전한 후 에탄올 용액과 3차 증류수로 세정하였다. 정제되지 않은 B-FOS 용액을 3차 증류수로 4 배 희석하여 로딩한 후 0-70% (v/v) 농도의 에탄올 수용액으로 용리하였다. 0-20% (v/v) 에탄올 수용액에 용리된 용액은 제외하고 30-70% (v/v) 에탄올 수용액에 용리된 부분을 수집했다 [13]. B-FOS의 정제는 박층크로마토그래피(TLC)로 확인하였다. 전개 용매로는 1-프로판올/3차 증류수/에틸 아세테이트(7:2:1, v/v)로 하여 정제된 B-FOS를 실리카겔 플레이트 60 F254(Merck, Darmstadt, Germany)에 점적했다. 발색시약으로 황산/에탄올(1:9, v/v) 용액을 플레이트에 분무한 후 110℃ 건조 오븐에서 10 분 동안 가열하였다 [34, 35]. 이후의 실험에서 사용된 TLC는 모두 이와 같은 방법으로 수행하였다. 정제된 B-

FOS는 고속진공농축기 ScanSpeed 40(Labogene, Lyngø, Denmark)로 농축하여 동결 건조기(Ilshin biobase, Yangju, Korea)로 동결 건조 시켰다 [13].

2.3 산성 및 열처리 조건에서 B-FOS의 변화

산성 조건에서의 B-FOS 분해 여부 확인을 위해 1 N 염산 용액으로 pH가 2, 3, 4로 조정된 인산 완충 용액(phosphate buffer saline, PBS) (900 μl)과 10%(w/v) B-FOS 용액(100 μl)을 실온에서 30 분, 1 시간, 3 시간 반응 시켰다. 열에 의한 분해 여부를 확인하기 위한 방법으로는 1%(w/v)의 B-FOS 용액 1 mL를 끓는 물에 15 분 열처리 하여 분해 여부를 확인하였다. B-FOS의 분해 여부는 TLC를 통해 확인하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다.

2.4 B-FOS가 장내 미생물 생장에 미치는 영향

나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), 프락토올리고당(FOS), 부티릴 프락토올리고당(B-FOS), 포도당(glucose)이 장내 세균의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, Louise *et al.* [36] 에 서술된 방법을 변형하여 수행하였다.

2.4.1 실험 배지 제조

균 성장 실험에 사용된 기본 배지는 당이 없는 BHIB(MB Cell, Los Angeles, CA, USA)이다. 기본 배지에 PBS와 NaB, FOS(BIFIDO), 포도당을 각각 첨가하여 B-FOS를 첨가한 배지와 비교하였다. NaB, FOS, B-FOS, 포도당은 멸균된 3차 증류수로 10%(w/v) 용액을 만든 후, 0.2 μm 멤브레인 필터(Pall Corporation, Michigan, USA)로 여과 후 사용하였다. 멸균된 당이 없는 BHIB에 각 물질의 농도가 1%, 0.5%(w/v)가 되도록 제조한 뒤 96-well 플레이트에 198 μl 씩 분주하였다 [13].

2.4.2 미생물의 생장곡선 측정

활성화된 균의 배양 배지에 있는 포도당 혹은 다른 탄소원을 제거하기 위해, 배양균을 원심분리($15,000 \times g$, 5 분)하고 상등액을 버린 후 가라 앉은 균체를 PBS(pH 7.4)로 2 번 세척 하였다 [35]. PBS에 풀어진 균 현탁액을 96-well 플레이트의 각 배지에 $2 \mu\text{L}$ 씩 접종한 후 Whitley jar gassing system(Don Whitley Scientific, Shipley, UK)을 사용하여 혐기 상태로 37°C 에서 24 시간 동안 배양하였다. 균의 증식은 배양액의 광학 밀도(optical density, OD) 값으로 확인하였으며 microplate reader(BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정한 후 생장 곡선을 그렸다. 균의 생장은 물질의 농도가 1%(w/v)일 때 최대 OD₆₀₀ 값을 비교하여 분석하였다 [37]. 균을 접종하지 않은 배지를 blank 로 설정하였고 3 번 실험을 반복하여 평균으로 나타내었다 [13]. 배양된 균의 배양 상등액은 이후 실험에 사용하기 위해 수집 하였다.

2.5 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 통한 장내 균의 B-FOS 이용 확인

2.5.1 균 배양액의 TLC 및 HPLC

B. longum BORI, *E. faecalis*의 배양액을 TLC로 분석하여 균에 의해 소비된 탄소원을 비교하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다. 또한, 대사산물의 분석을 위하여 *B. longum* BORI, *E. faecalis*, *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum*, *E. coli*, *B. longum* RD47의 배양 상등액을 HPLC로 분석하였다. 젖산(lactic acid)과 초산(acetic acid), 부티르산(butyric acid)의 생성 여부를 확인하였으며 외부 표준물질들을 시료와 같은 조건에서 분석하여 각각 4 가지 농도에서 검량곡선을 작성하였다. 대조균은 균을 넣지 않은 배지로 설정하였다. YL9100 HPLC system(Younglin, Anyang, South Korea)이 사용되었고 Aminex HPX-87H column, $300 \times 7.8 \text{ mm}$ column(Bio-rad, California, USA)을 사용

하였다. 이동상으로는 5 mM 황산이 사용되었고 유속은 0.6 mL/min, 컬럼 온도는 50℃로 유지하였다. 모든 배양액은 PVDF Acrodisc syringe filter(0.2 μ m, 13 mm, Pall Corporation, Michigan, USA)로 여과하고 20 μ l 주입하였다. 이후 실험의 모든 HPLC는 이와 같은 조건으로 행해졌다.

Table 2. Conditions of HPLC for analysis of lactic acid, acetic acid, and butyric acid

Instrument	YL9100 HPLC system
Column	Aminex HPX-87H column 300 × 7.8 mm
Mobile phase	5 mM H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Temperature	50°C
Detection	Refractive Index(RI)
Injection volume	20 μl

2.5.2 B-FOS와 균 배양액, 균체, 균체 파쇄액의 반응

균에 의한 B-FOS의 분해 여부를 확인하기 위해 사용된 균주는 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *E. faecalis*이다. 균 현탁액은 원심 분리하여 균체와 배양액을 분리하였다. 균체는 PBS로 2회 세척한 후 PBS에 현탁한 현탁물을 사용하였다. 균체 파쇄액은 PBS에 현탁한 현탁물을 초음파 파쇄기(Qsonica, Newtown, CT, U.S.A)로 5 분 간격으로(amp 38%) 10 분 동안 파쇄한 후 원심분리($15,000 \times g$, 10 분)하고 상등액을 균체 파쇄액으로 사용하였다. 대조군은 균이 들어가지 않은 그룹으로 설정하였다. 균 배양액, 균체 현탁액, 균체 파쇄액($180 \mu\text{l}$)을 각각 10%(w/v)의 B-FOS, FOS 용액($20 \mu\text{l}$)과 1 시간 동안 37°C 에서 반응 시킨 후 끓는 물에 10 분 가열하여 반응을 중지시켰다. TLC를 통해 반응 전 후 결과를 비교했으며 부티르산의 분해 여부는 HPLC를 이용하여 분석하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.6 B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향

높은 농도(4.5 g/L)의 포도당을 함유한 Caco-2 세포의 표준 배양 배지에서 세포 생장의 에너지원으로써 포도당이 주로 사용되는 현상을 배제하기 위해 포도당이 없는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는 조건일 때와 세포의 생장을 비교하였다 [38].

2.6.1 실험 배지 제조

NaB, FOS, B-FOS는 PBS로 10%(w/v)용액을 만든 후, $0.2 \mu\text{m}$ 멤브레인 필터로 여과하였다. 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 함유된(Glu+Pyr+) DMEM 배지와 함유되지 않은(Glu-Pyr-) DMEM 배지에 NaB, FOS, B-FOS가 각각 0.005-0.06%(w/v)가 되도록 제조한 후 실험

에 사용하였다.

2.6.2 Trypan blue 색소 배제법(dye exclusion assay)을 통한 Caco-2 세포의 수 측정

25 cm² 플라스크(SPL Life Science, Pocheon, South Korea)에 5×10^5 세포로 1.5 mL씩 접종하고 50%의 융합성(confluent)을 보일 때까지 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 3 일 동안 배양하였다. 이후 0.005–0.06% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 첨가된 배지로 교체 후 같은 조건에서 4 일 동안 배양하였다. 배양 상등액은 실험에 사용하기 위해 수집했고 부착 세포는 PBS로 2 회 세척하고 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크에서 분리하였다. 분리된 세포는 0.4% trypan blue 용액으로 염색하여 hemacytometer(Marienfeld-Superior, Berlin, Germany)로 살아있는 세포의 수를 측정하였다 [39]. 대조군은 PBS를 첨가한 배지로 설정하였고 3 번 실험을 반복하여 평균으로 나타내었다.

2.7 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해 여부

2.7.1 Caco2 세포 배양액의 TLC 및 HPLC

수집한 Caco-2 세포 배양액을 TLC로 분석하여 소비된 탄소원을 확인했고 HPLC를 통해 부티르산의 존재 여부를 조사하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.7.2 B-FOS와 세포 배양액, 세포, 세포 파쇄액의 반응

Caco-2 세포에 의한 B-FOS의 분해 여부를 확인하기 위하여 일반 배지에서 배양된 Caco-2 세포의 배양 상등액을 세포 배양액으로 사용했다. 세포 현탁액은 trypsin/EDTA를 처리하여 분리된 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 현탁한 현탁물을 사용했고 현탁물을 초음파 파쇄기를 이용하여 4 분 간격으로(amp 25%) 8 분 동안 파쇄해 원심분리 후 얻은 상등액

을 세포 파쇄액으로 사용하였다. 세포 배양액, 현탁액, 파쇄액(450 μl)은 10% (w/v) FOS, B-FOS(50 μl)와 3 시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 분해 여부는 TLC를 통해 반응 전과 후를 비교했으며 HPLC를 이용하여 B-FOS로부터 부티르산의 분해 여부를 분석하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.8 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석에 의한 세포 생존율 측정

B-FOS로 유도되는 세포독성을 확인하기 위해 MTT 분석을 실시하였다. Caco-2 세포를 96-well 플레이트에 well 당 2,000 세포의 농도로 100 μl 씩 분주하여 48 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 이 후 기존 배지를 제거하고 0.02-0.1% (w/v) 농도의 NaB, FOS, B-FOS가 첨가된 배지(180 μl)로 교체하고 24 시간, 48 시간, 72 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 5 mg/mL MTT 용액(20 μl)을 각 well에 가하여 다시 4 시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 형성된 결정은 dimethyl sulfoxide(DMSO) (100 μl)를 가하여 용해시키고 570 nm에서 microplate spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 물질을 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 산출하였고 4 번 실험을 반복하여 평균을 나타내었다 [40].

2.9 전기 저항값(Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER) 측정

치밀이음부(tight junction)는 세포 장벽을 형성하는 세포 간 접합으로 치밀이음부(tight junction)의 이온 투과성은 일반적으로 세포 단층의 TEER을 측정하여 확인한다 [41]. Caco-2 세포를 12-well transwell system 플레이트에 1.5×10^6 세포의 농도로 상층부(apical chamber)에 0.5 mL씩 분주하고 하층부(basal chamber)에 배지 1.5 mL를 분주하였다. 37°C에서 5% CO₂ 세포배양기에서 3 일 동안 배양한 후 0.02, 0.08% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 포함된 배지로 바꿔주었고

대조군으로 PBS를 넣은 배지를 사용했다. TEER은 epithelial voltohmmeter(Millicell ERS system, Millipore, Bedford, MA, USA)을 사용하여 4 일 동안 24 시간 간격으로 측정하였다. 세포가 없는 well의 TEER 값을 blank로 사용하였으며 측정된 값과 플레이트의 면적을 이용하여 결과 값을 계산하였다. 실험은 3 번 반복하여 평균으로 나타내었다 [40].

2.10 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 처리한 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량 측정

LPS 자극에 의한 IL-8의 생성량에 B-FOS가 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-29 세포를 사용하였다 [42]. 96-well 플레이트에 HT-29 세포를 1×10^4 세포로 150 μ l씩 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24 시간 동안 배양 한 후 LPS(100 ng)와 0.1%(w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 포함된 배지로 교환하여 같은 조건에서 배양하였다 [43]. 처리 물질의 농도는 선행연구를 토대로 HT-29 세포에서 48시간 까지 NaB에 의해 독성을 나타내지 않는 최대농도인 0.1%(w/v)로 설정하였다 [44]. 분비된 IL-8의 양은 3 시간, 24 시간, 48 시간 때 각 플레이트의 배양 상등액을 수집하여 Human IL-8 ELISA kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조업체로부터 제공된 프로토콜에 따라 측정하였다. 실험은 3 번 반복하여 평균으로 나타내었다.

2.11 위장 상피세포주인 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부

AGS 세포에 의한 B-FOS 분해 여부를 확인하기 위하여 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는 DMEM배지와 포도당과 피루브산이 없는 DMEM 배지에 0.06%(w/v)의 FOS와 B-FOS를 첨가하여 AGS 세포를 37°C에서 5% CO₂ 세포배양기에서 4 일 동안 배양 하였다. 이후 TLC를 통해 B-FOS의 분해 여부를 확인하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다.

3. 통계처리

모든 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Ver. 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 통계처리는 일원분산분석(One-Way Analysis of Variance)을 실시하고 유의한 차이가 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후 검증 하였으며 Caco-2 세포 단층의 전기 저항값 (TEER)의 경우 최소 유의차 검정(LSD)에 의해 평균간의 유의차를 검정 하였다. 등분산 가정을 충족하지 않은 경우에는 Welch's test로 분석하고, 유의한 차이가 있는 경우 Games-Howell test로 사후 검증하였다. 유의수준은 P 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

4. 결과

4.1 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 정제 결과

컬럼 크로마토그래피를 이용한 정제과정에서 0-70% (v/v) 에탄올 수용액에 용리된 물질의 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 결과는 Fig. 1에 나타냈으며 30-70% (v/v) 에탄올 수용액에서 정제된 B-FOS를 확인하였다.

4.2 산과 열처리에서 B-FOS의 안정성

끓는 물에서 15 분 열 처리된 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)과 B-FOS, pH 2-4로 조정된 PBS에서 30 분, 1 시간, 3 시간 노출된 B-FOS의 TLC분석 결과는 Fig. 2에 나타냈다. 분석 결과, 열 처리된 FOS와 B-FOS는 TLC 상 변화가 없는 것이 확인되었으며 이 같은 조건에서 안정한 것으로 보인다. 또한, 산성조건(pH 2-4)에서 B-FOS는 3 시간 까지 TLC 상 변화가 없었으며 이 같은 조건에서 안정한 것으로 사료된다.

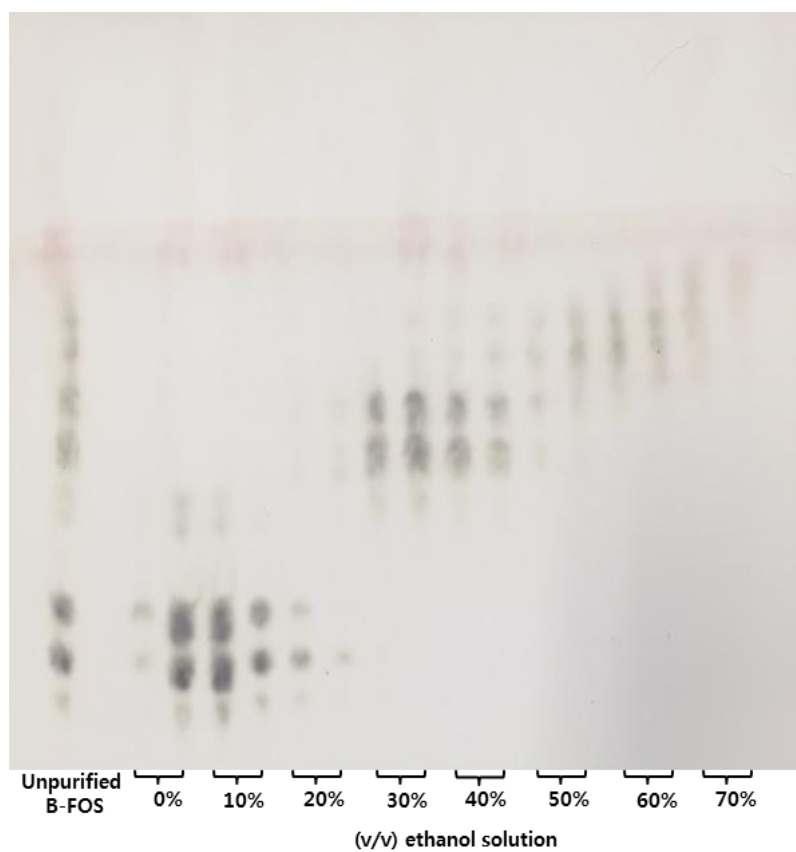


Fig. 1. Determination of butyryl-fructooligosaccharides during purification by TLC

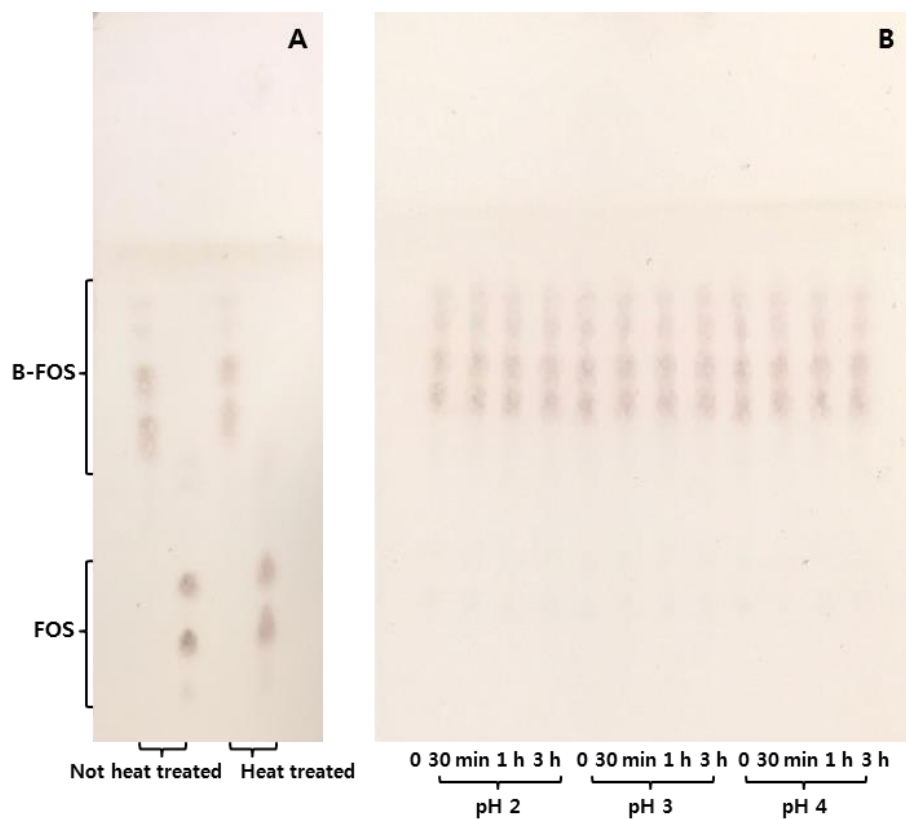


Fig. 2. Assessment of stability of B-FOS by TLC. FOS and B-FOS treated for 10 min in boiling water(A) and B-FOS treated for 30 min, 1 h, and 3 h under pH 2–4 (B).

4.3 나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), FOS, B-FOS, 포도당이 장내 세균의 생장에 미치는 영향

0.5, 1% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS, 포도당이 첨가된 배지에서 균의 생장 곡선을 측정한 결과는 Fig. 3 - Fig. 5와 같으며 물질의 농도가 1% (w/v)일 때 14 개 균주의 최대 OD₆₀₀ 값을 Table 3에 나타내었다. 양성대조군으로서 포함된 포도당은 실험에 사용된 모든 균에 의해 잘 이용되었다. 탄소원이 없는 기본 배지는 음성대조군으로 포함되었으며 음성대조군과 NaB가 포함된 배지에 배양된 균은 양성대조군보다 낮은 수준으로 대부분 잘 성장하지 못하였다. 특히, 음성대조군에서 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)에 속하는 *Staphylococcus aureus* (OD₆₀₀ = 0.36)와 *Clostridium butyricum* (OD₆₀₀ = 0.49)은 1% (w/v)의 NaB가 존재할 때, 최대 OD₆₀₀ 값이 각각 0.25, 0.42로 균의 생장이 유의적으로 저해된 결과를 나타내었다. 비피도박테리아의 생장곡선은 Fig. 3과 같으며 음성대조군과 비교했을 때 *Bifidobacterium longum* RD72와 *B. animalis*를 제외한 모든 비피도박테리아 균주는 FOS가 첨가되었을 때 유의적으로 최대 OD₆₀₀ 값이 높았으며 생장이 촉진되는 결과를 보였다. 한편, B-FOS는 *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B. catenulatum*과 *B. animalis*의 생장을 유의적으로 촉진했으며 특히 *B. bifidum* BGN4와 *B. longum* BORI는 대조군보다 최대 OD₆₀₀ 값이 약 2 배 높았다. 또한, *B. bifidum* BGN4와 *B. animalis*는 FOS가 존재할 때와 유의적으로 차이가 없었으며 FOS와 같은 수준으로 B-FOS가 균의 생장을 촉진한 결과를 나타냈다. 젖산균의 생장 곡선은 Fig. 4에 나타내었다. FOS는 음성대조군에 비해 모든 젖산균의 생장을 유의적으로 촉진했으며 B-FOS는 *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*와 *Streptococcus thermophilus*의 생장을 각각 약 3 배, 1.2 배, 5 배 유의적으로 증가시켰다. Non-probiotic 균주의 생장곡선은 Fig. 5와 같다. FOS는 *S. aureus*, *Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*를 제외한 대다수의 non-probiotic 균주의 생장을 유의적으로 촉진

진하였다. 반면, B-FOS는 대다수 균주의 생장을 촉진하지 않았으며 음성 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 *Listeria monocytogenes*, *Prevotella intermedia*, *C. perfringens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*의 생장은 각각 약 1.4 배, 1.5 배, 2 배, 3 배 증가하였다.

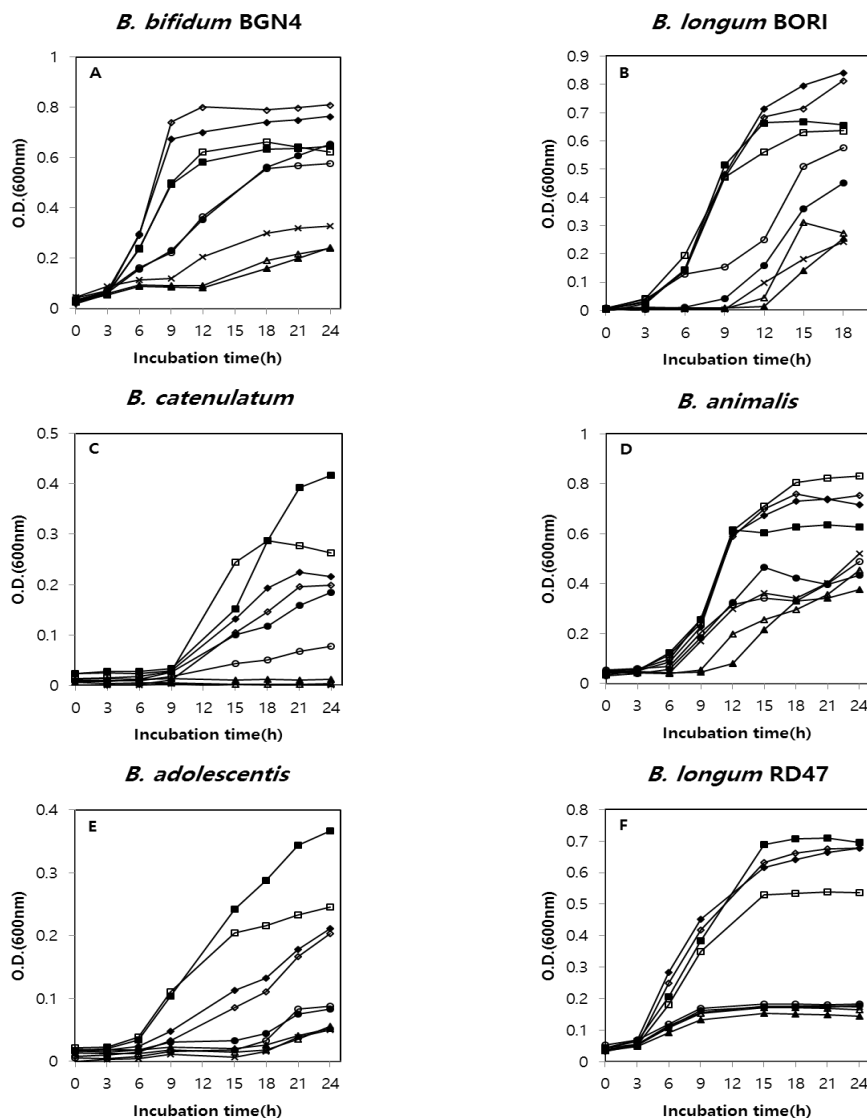


Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(\triangle), FOS(\square), B-FOS(\circ), glucose(\diamond) and 1% (w/v) NaB(\blacktriangle), FOS(\blacksquare), B-FOS(\bullet), glucose(\blacklozenge), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

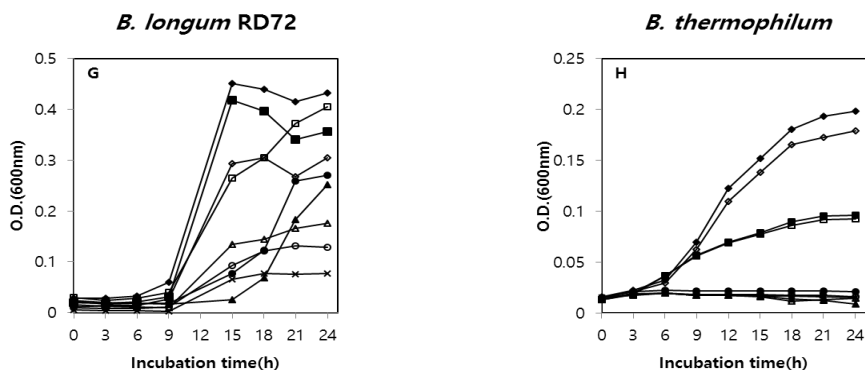


Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients(continued). Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(△), FOS(□), B-FOS(○), glucose(◇) and 1% (w/v) NaB(▲), FOS(■), B-FOS(●), glucose(◆), and sterile DI water(X) at 37 °C under anaerobic conditions.

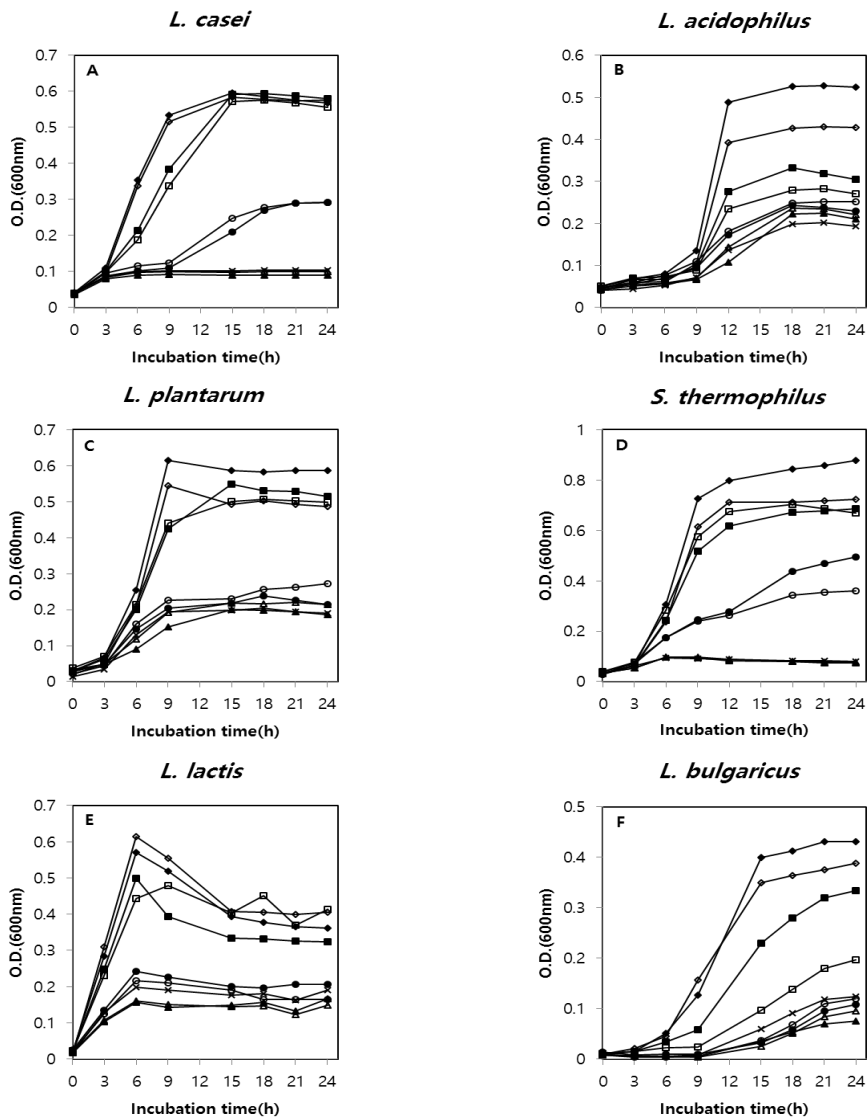


Fig. 4. Growth curve of lactic acid bacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(\triangle), FOS(\square), B-FOS(\circ), glucose(\diamond) and 1% (w/v) NaB(\blacktriangle), FOS(\blacksquare), B-FOS(\bullet), glucose(\blacklozenge), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

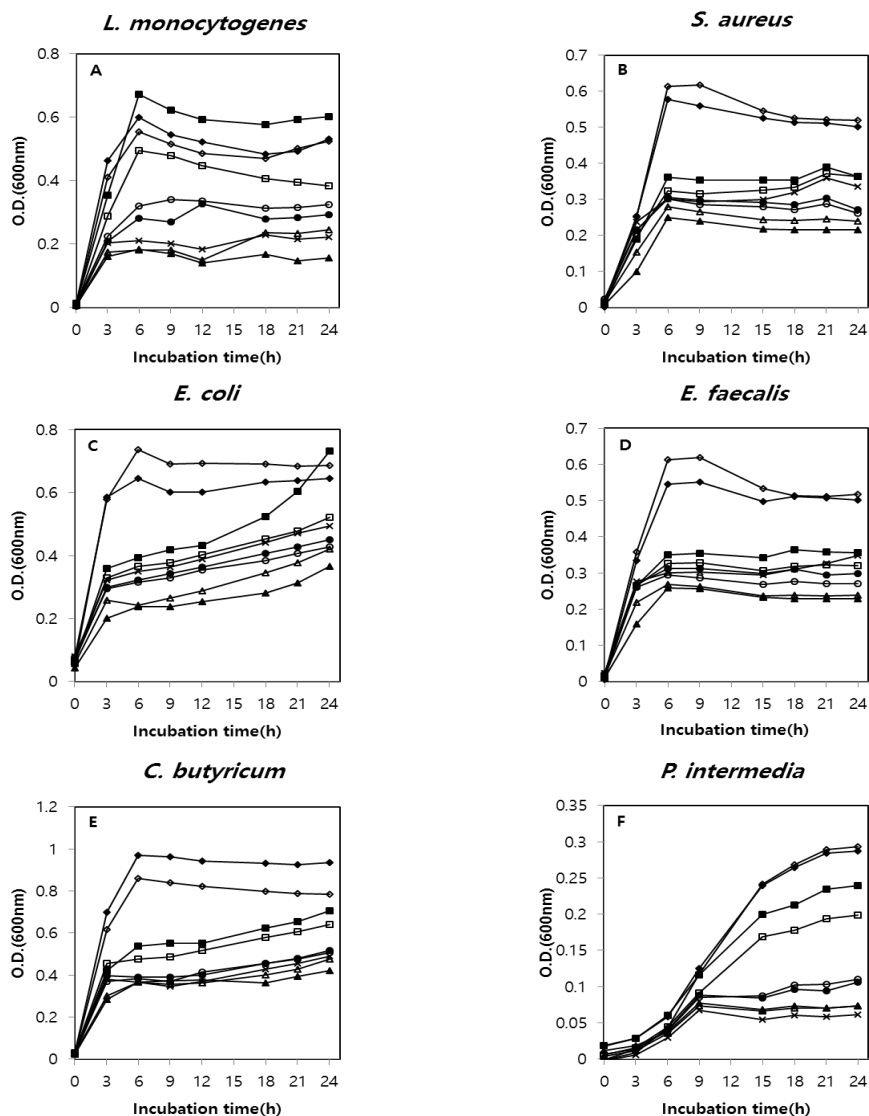


Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB (△), FOS (□), B-FOS (○), glucose (◇) and 1% (w/v) NaB (▲), FOS (■), B-FOS (●), glucose (◆), and sterile DI water (X) at 37 °C under anaerobic conditions.

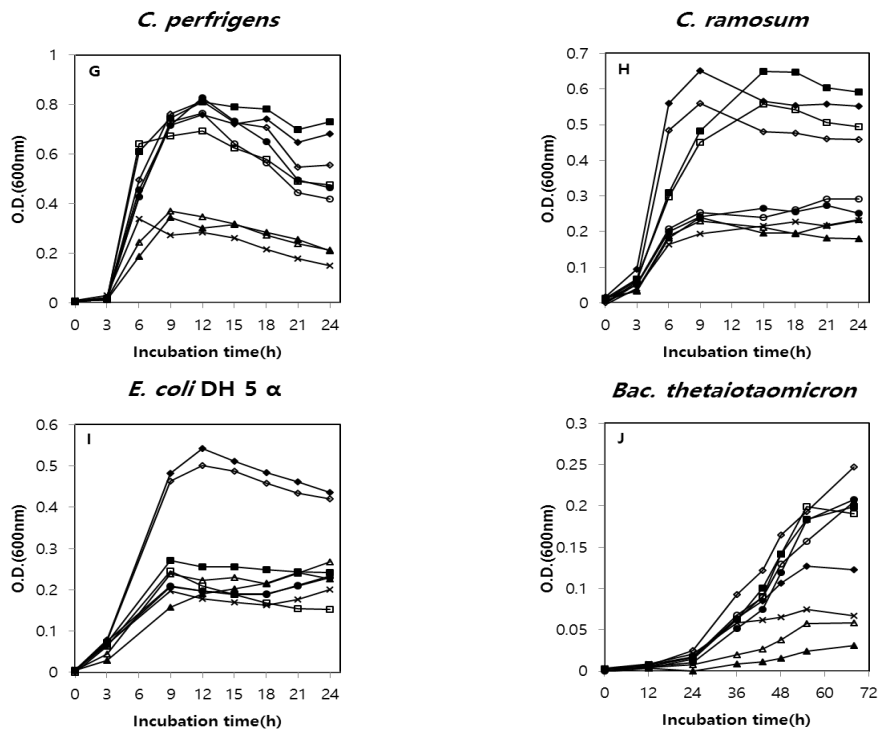


Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients(continued). Each medium containing 0.5%(w/v) NaB(\triangle), FOS(\square), B-FOS(\circ), glucose(\diamond) and 1%(w/v) NaB(\blacktriangle), FOS(\blacksquare), B-FOS(\bullet), glucose(\blacklozenge), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

Table 3. Maximum growth(OD₆₀₀ nm) of bacteria cultured in media containing different ingredients at 37°C under anaerobic conditions

Strains	Control		NaB		FOS		B-FOS		Glucose	
	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)
<i>B. longum</i> BORI	0.24±0.05 ^a	18	0.25±0.04 ^a	18	0.67±0.01 ^c	18	0.45±0.05 ^b	18	0.84±0.04 ^d	18
<i>B. adolescentis</i>	0.05±0.01 ^a	24	0.05±0.03 ^a	24	0.37±0.03 ^c	24	0.08±0.02 ^a	24	0.21±0.06 ^b	24
<i>B. longum</i> RD47	0.18±0.01 ^a	18	0.15±0.01 ^a	15	0.71±0.02 ^b	21	0.18±0.01 ^a	24	0.68±0.05 ^b	24
<i>L. casei</i>	0.1±0.01 ^a	24	0.09±0.00 ^a	9	0.59±0.02 ^c	18	0.29±0.03 ^b	24	0.6±0.01 ^c	15
<i>L. acidophilus</i>	0.2±0.02 ^a	21	0.22±0.01 ^a	21	0.33±0.03 ^b	18	0.24±0.01 ^a	18	0.53±0.02 ^c	21
<i>L. plantarum</i>	0.2±0.01 ^a	18	0.2±0.02 ^a	15	0.55±0.04 ^b	15	0.24±0.00 ^a	18	0.61±0.04 ^c	9
<i>L. bulgaricus</i>	0.12±0.05 ^a	24	0.08±0.07 ^a	24	0.33±0.13 ^b	24	0.11±0.06 ^a	24	0.43±0.06 ^b	24
<i>L. lactis</i>	0.2±0.00 ^a	6	0.17±0.02 ^a	24	0.5±0.03 ^c	6	0.24±0.01 ^b	6	0.57±0.02 ^d	6
<i>L. monocytogenes</i>	0.23±0.06 ^a	18	0.18±0.01 ^a	6	0.67±0.06 ^c	6	0.33±0.13 ^b	12	0.6±0.02 ^c	6
<i>S. aureus</i>	0.36±0.04 ^{bc}	21	0.25±0.02 ^a	6	0.39±0.05 ^c	21	0.31±0.01 ^{ab}	6	0.58±0.03 ^d	6
<i>C. butyricum</i>	0.49±0.01 ^b	24	0.42±0.02 ^a	24	0.71±0.03 ^c	24	0.52±0.01 ^b	24	0.97±0.04 ^d	6
<i>P. intermedia</i>	0.07±0.00 ^a	9	0.08±0.00 ^a	9	0.24±0.01 ^c	24	0.11±0.01 ^b	24	0.29±0.01 ^d	24
<i>C. ramosum</i>	0.23±0.01 ^a	24	0.24±0.01 ^a	9	0.65±0.06 ^b	15	0.27±0.04 ^a	21	0.65±0.02 ^b	9
<i>C. perfringens</i>	0.34±0.04 ^a	6	0.34±0.01 ^a	9	0.81±0.02 ^{bc}	12	0.83±0.0 ^c	12	0.76±0.04 ^b	12

TRMG represents the time needed in hours to reach the maximum optical density (OD₆₀₀). The concentrations of PBS, NaB, FOS, B-FOS, and glucose are 1% (w/v).

Data are expressed as means ± SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences of the effect of the ingredients followed by Duncan' s test after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.4 장내 균의 B-FOS 이용 및 분해

4.4.1 배지의 탄소원 종류에 따른 균 배양 상등액 분석

탄소원으로써 FOS, B-FOS, 포도당을 각각 포함한 배지에서 배양된 *B. longum* BORI와 *E. faecalis*의 배양 상등액 TLC 결과는 Fig. 6에 나타냈으며 균을 접종하여 배양했을 때 균을 접종하지 않았을 때 비해 배양 상등액에서 탄소원인 FOS, B-FOS, 포도당의 밴드가 없어지거나 밴드의 세기가 약해지는 결과를 보였다. B-FOS의 경우 *E. faecalis*보다 *B. longum* BORI를 배양했을 때 밴드의 세기가 더 약해지는 결과를 나타냈다. *B. longum* BORI를 포함하여 B-FOS 배지에서 생장이 촉진됐던 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum* 균 4 개와 생장이 촉진되지 않았던 *E. coli*, *B. longum* RD47, *E. faecalis* 균 3 개의 배양 상등액에 있는 젖산, 초산, 부티르산을 고성능 액체 크로마토 그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 확인한 결과는 Table 4에 나타냈다. NaB 배지에서 배양된 모든 균주의 배양액에서는 부티르산이 검출되었다. 반면, FOS와 포도당이 첨가된 배지에서는 모든 균주에서 많은 양의 초산과 젖산이 검출되었고 초산에 비해 젖산의 양이 더 많았다. B-FOS 배지의 경우 FOS와 포도당이 첨가된 배지에서 검출되지 않은 부티르산이 *E. coli*와 *B. longum* RD47을 제외한 모든 균주의 배양 상등액에서 검출되었다. 특히, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum*, *Bac thetaiotaomicron*의 배양 상등액에서 많은 양의 젖산과 초산이 검출된 결과를 확인할 수 있었다.

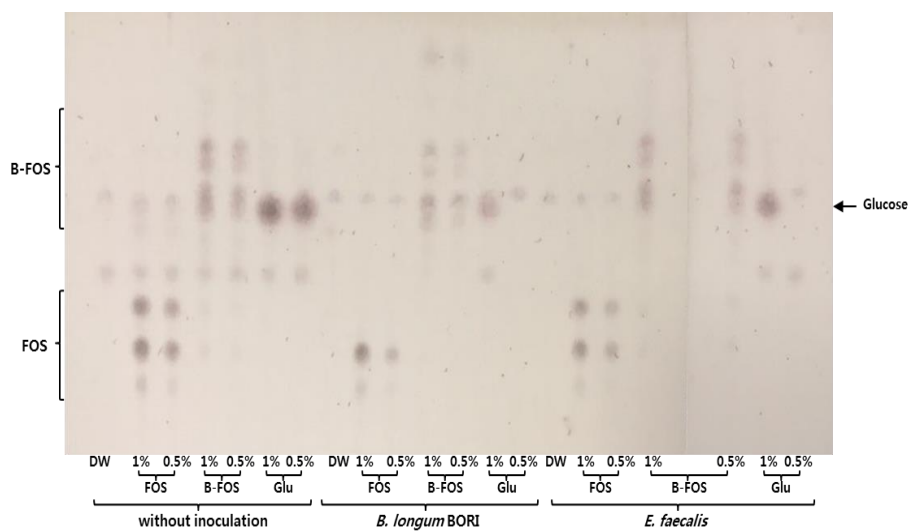


Fig. 6. TLC analysis of culture supernatants of *B. longum* BORI and *E. faecalis* cultured in medium with different carbon source

Table 4. Detection of organic acids in culture supernatants of bacteria cultured in media containing different ingredients

	Control			NaB			FOS			B-FOS			Glucose		
	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid
PBS	+	+	-	+	+	+++	++	++	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. bifidum</i> BGN4	++	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+++	+	+	+++	+	-
<i>B. longum</i> BORI	+	+	-	+	+	+++	++	++	-	+	++	+	+++	++	-
<i>B. catenulatum</i>	+	+	-	++	+	+++	++	++	-	++	++	+	++	++	-
<i>B. longum</i> RD47	+	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+	+	-	+++	+	-
<i>L. casei</i>	++	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+++	++	+	+++	+	-
<i>Bac. thetaiotaomicron</i>	-	++	-	-	+	+++	++	+	-	++	+	+	++	++	-
<i>E. coli</i>	-	++	-	-	+	+++	++	++	-	+	+	-	+++	++	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+	+	+	+++	+	-
<i>Bac. fragilis</i>	+	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+	+	+	+++	+	-

The number of ‘+’ represents the concentration of organic acid.

‘-’ ; not detected, ‘+’ ; 0.05% (v/v) or less, ‘++’ ; 0.05% (v/v) – 0.25% (v/v), ‘+++’ ; more than 0.25% (v/v)

4.4.2 B-FOS와 균 배양 상등액, 균체, 균체 파쇄액의 반응 결과

B. bifidum BGN4, *L. casei*, *E. faecalis*의 균체, 균 파쇄액, 균 배양액을 FOS, B-FOS와 각각 반응 시켜 봄으로써 균에 의한 B-FOS의 분해 여부를 TLC로 확인한 결과는 Fig. 7에 나타났다. FOS는 모든 반응에서 반응 전 후 TLC 상 변화가 없었다(Fig. 7A, B). 한편, 균체와 균 파쇄액을 B-FOS와 반응 시켰을 때 반응 전에 비해(Fig. 7A) 3 개의 균주에서 모두 FOS의 밴드가 생성되는 것이 확인되었고 균 배양 상등액과 반응했을 때는 확인되지 않았다(Fig. 7B). HPLC를 통해 부티르산의 검출 여부를 분석한 결과는 Table 5에 나타내었다. 3 개의 균주 모두 균체와 균 파쇄액이 B-FOS와 반응했을 때 부티르산이 검출됐지만, 균 배양 상등액과 반응했을 때는 검출되지 않았다. 또한, 분석된 균에 의하면 이러한 반응은 분석된 모든 균에서 발생함을 확인할 수 있었다.

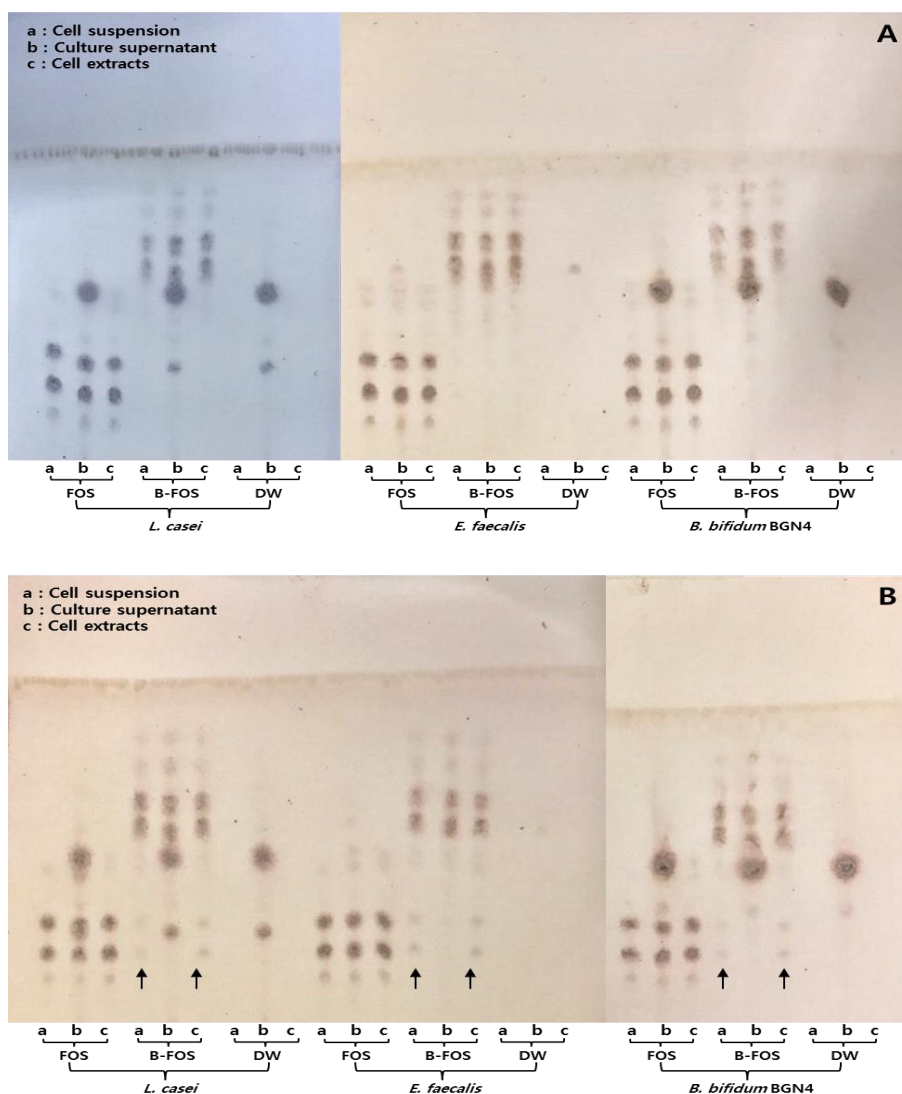


Fig. 7. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by bacteria. Before the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants, and cell extracts(A) and after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants, and cell extracts (B).

Table 5. Detection of butyric acid by HPLC after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatant, and cell extracts

	<i>B. bifidum</i> BGN4		<i>L. casei</i>		<i>E. faecalis</i>	
	B-FOS	DI water	B-FOS	DI water	B-FOS	DI water
Cell suspension	+	-	+	-	+	-
Culture supernatant	-	-	-	-	-	-
Cell extract	+	-	+	-	+	-

‘+’ ; Butyric acid was detected, ‘-’ ; Butyric acid was not detected

4.5. 배지 구성에 따른 Caco-2 세포 생장의 변화

포도당과 피루브산의 유무에 따라 NaB, FOS, B-FOS를 0-0.06% (w/v)의 농도로 첨가하여 4 일 동안 배양 한 후 각 물질의 농도에 따른 세포 수를 센 결과는 Fig. 8에 나타냈다. 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는(Glu+Pyr+) 배지에 NaB를 첨가했을 때 0.005%, 0.04%, 0.06% (w/v)의 농도에서 대조군에 비해 각각 약 30%, 50%, 65%의 세포 수가 유의적으로 감소하였다(Fig. 8A). 한편, 포도당과 피루브산이 존재하지 않는(Glu-Pyr-) 경우는 0.005%, 0.02% (w/v)에서 세포 수가 증가하는 양상을 보였지만 0.04% (w/v)까지 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 하지만 0.06% (w/v)의 농도에서 대조군보다 35% 감소하여 유의적으로 낮은 결과를 보였다(Fig. 8B). FOS를 첨가한 배지에서는 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지의 경우 모두 대조군과 유의적인 차이가 없었다(Fig. 8C, D). B-FOS를 첨가했을 때 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지는 모두 0.02% (w/v)까지 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 0.06% (w/v)의 농도에서 각각 약 1.5 배, 1.7 배 세포 수가 유의적으로 증가한 결과를 보였다(Fig. 8E, F).

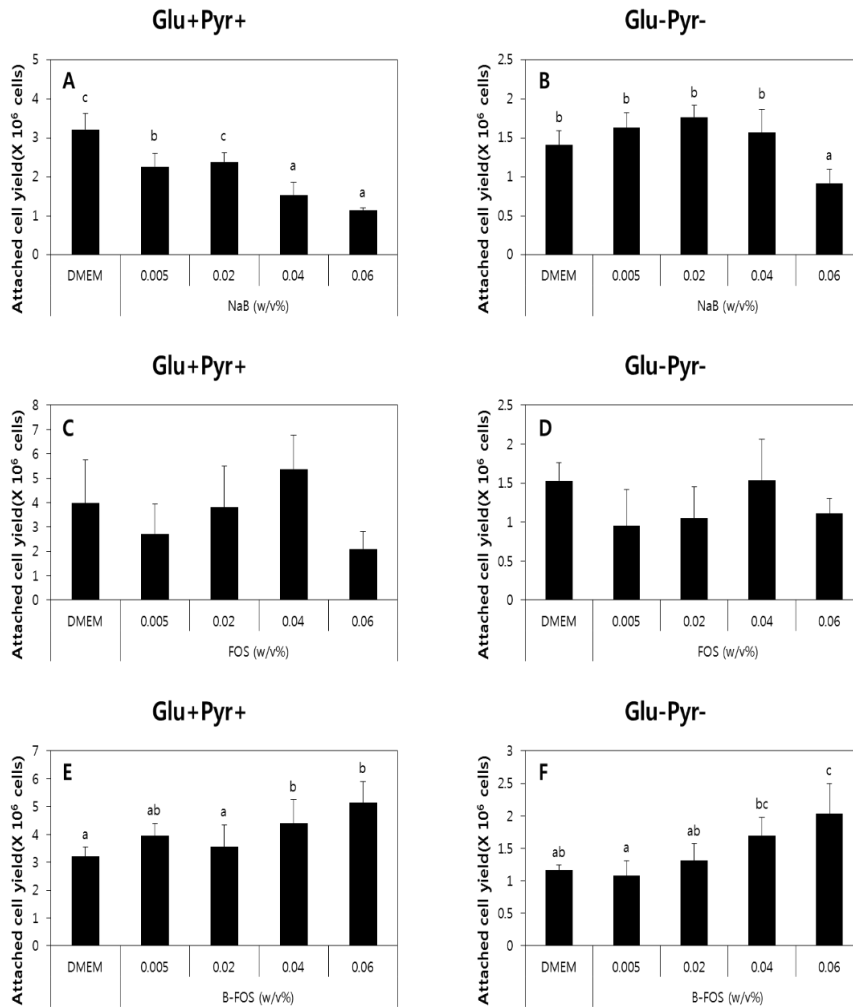


Fig. 8. Change in the number of Caco-2 cells depending on the presence of glucose and pyruvate. The number of Caco-2 cells treated with NaB(A, B), FOS(C, D), and B-FOS(E, F).

‘Glu+Pyr+’ and ‘Glu-Pyr-’ represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

Data are expressed as means \pm SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences of the effect of the concentration followed by Duncan’s test after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.6 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해

4.6.1 Caco-2 세포 배양 상등액의 TLC 및 HPLC

FOS와 B-FOS가 포함된 배지에서 Caco-2 세포를 배양한 후 배양 상등액을 TLC로 분석한 결과는 Fig. 10과 같다. Glu+Pyr+배지에 존재하는 포도당 밴드는 배양한 후 모든 배지에서 완전히 사라졌으나 FOS는 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지에서 모두 TLC 상 변화가 없었다. B-FOS가 포함된 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지의 배양 상등액에서는 FOS 밴드가 생성됨을 확인하였고 Glu+Pyr+배지 보다 Glu-Pyr-배지일 때 더 뚜렷한 밴드를 나타냈다. B-FOS 밴드의 경우 Glu-Pyr-배지에서 다소 사라지는 결과를 볼 수 있었다. 따라서 B-FOS는 Caco-2 세포에 의해 이용되었음을 확인할 수 있었고 이용 결과 FOS가 생성됨을 확인할 수 있었다. 배양 후 수집한 세포 배양액과 세포 파쇄액에서 부티르산 존재 여부를 확인한 결과에서는 두 경우 모두 부티르산이 검출되지 않았다(data not shown).

4.6.2 B-FOS와 Caco-2 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액의 반응 결과

Caco-2 세포의 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에 FOS와 B-FOS를 각각 반응 시킨 후 TLC를 통해 확인한 결과는 Fig. 10에 나타냈다. FOS는 모든 반응에서 반응 전 후 TLC 상 변화가 없었다. 한편, B-FOS와 반응시킨 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에서 모두 FOS 밴드의 생성이 확인되었다. HPLC를 통해 B-FOS로부터 부티르산의 분해 여부를 확인하기 위해 분석한 결과 B-FOS와 반응한 세포 배양액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에서 미량의 부티르산이 확인됐다(data not shown).

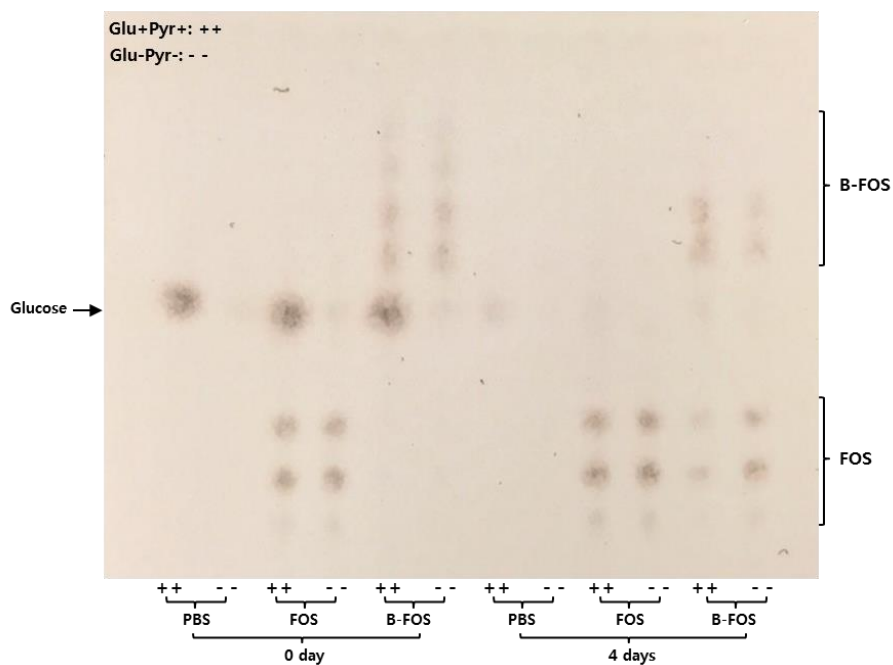


Fig. 9. TLC analysis of the culture supernatants of Caco-2 cells cultured for 4 days in media with FOS and B-FOS

'Glu+Pyr+(++)' and 'Glu-Pyr-(- -)' represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

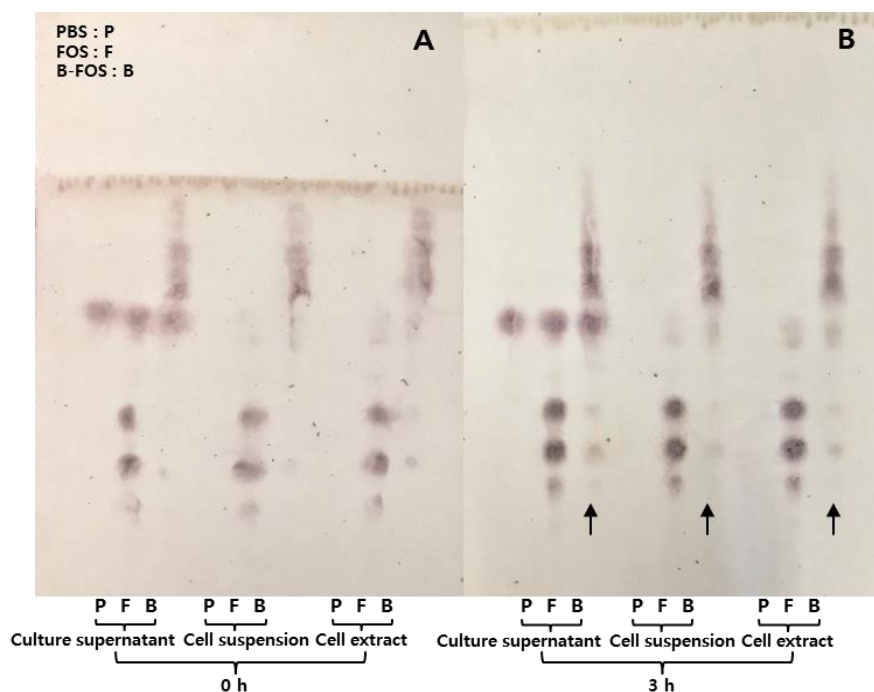


Fig. 10. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by Caco-2 cells. Before the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants and cell extracts(A) and after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants and cell extracts(B).

4.7 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석

NaB, FOS, B-FOS가 Caco-2 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT 분석을 실시하여 세포독성을 확인하였다. Fig. 11A에서 보인 바와 같이 NaB는 48 시간 후 0.1% (w/v)의 농도에서 세포 생존율이 $81 \pm 15\%$ 로 유의적으로 감소하였다. 또한, 72 시간 후 0.1% (w/v) 농도에서는 $45 \pm 6.9\%$ 까지 유의적으로 감소하였다. 반면, FOS와 B-FOS는 72 시간 동안 실험된 모든 농도에서 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 0.1% (w/v)의 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 것으로 보인다(Fig. 11B, C).

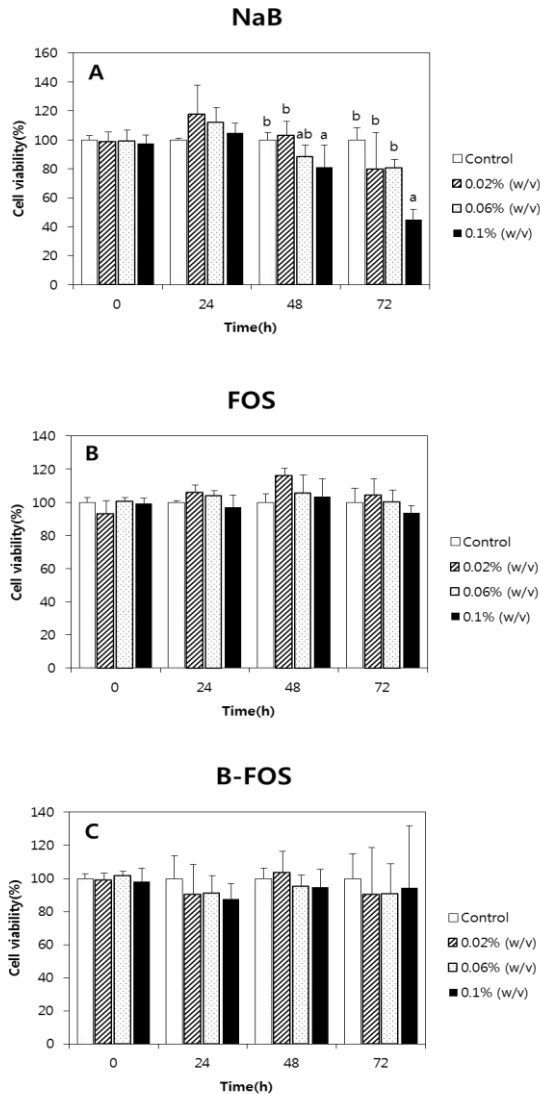


Fig. 11. MTT assays of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS. Cell viabilities of Caco-2 cells treated with NaB(A), FOS(B), and B-FOS(C).

Data are expressed as means \pm SD for n=4. One-way ANOVA followed by Duncan's test was used to test significance of the effect of the concentration after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.8 전기 저항값(Trans-epithelial electrical resistance, TEER) 측정

B-FOS가 치밀이음부(tight junction)의 온전성(integrity)에 미치는 영향을 조사하기 위해 시간에 따른 TEER 값을 측정하였으며 결과는 Fig. 12에 나타냈다. 0.02%(w/v)의 NaB 처리 후 96 시간 까지 TEER 값은 유의적으로 증가하는 결과를 보였으며 NaB 처리 후 96 시간 시점에서 $226 \pm 43.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 으로 모든 군에 비해 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 12A). 반면, 0.08%(w/v)의 NaB를 처리했을 경우 72 시간 후부터 모든 군에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였다(Fig. 12B). 한편, FOS와 B-FOS는 두 농도에서 모두 유의적인 차이가 없었다(Fig. 12A, B).

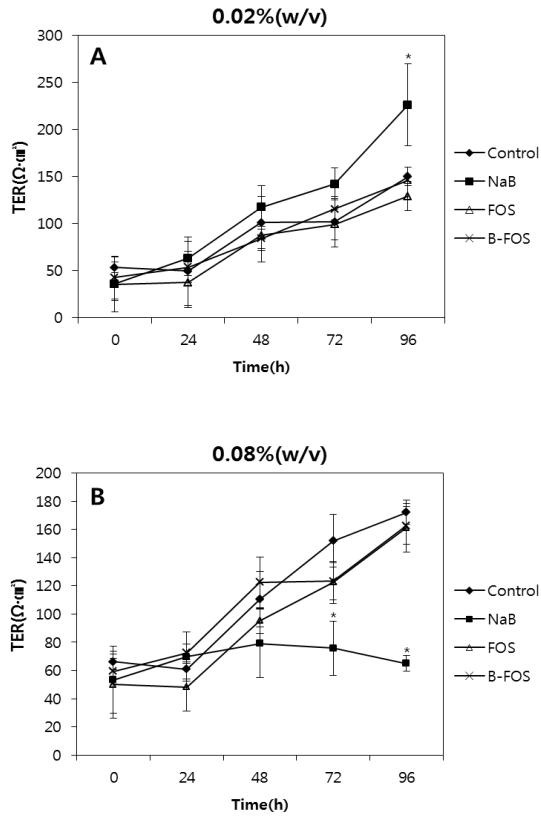


Fig. 12. TEER values of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS. TEER values of Caco-2 cells treated with 0.02% (w/v) (A) and 0.08% (w/v) (B) of substances (NaB, FOS and B-FOS).

Data are expressed as means \pm SD for $n=3$. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and applying the least significant range tests. Asterisk indicates significant difference between control and treatment groups (NaB, FOS, and B-FOS) ($P < 0.01$).

4.9 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량

LPS로 HT-29 세포의 IL-8 생성을 자극했을 때 B-FOS가 미치는 영향을 확인하고자 ELISA를 실시하였으며 결과는 Fig. 13와 같다. HT-29 세포에 LPS를 처리한 그룹은 3 시간 후부터 처리하지 않은 그룹에 비해 유의적으로 IL-8 생성량이 증가하였다. LPS와 0.1%(w/v)의 NaB를 함께 처리했을 경우 24 시간 후 LPS만 처리한 군에 비해 IL-8 생성량이 약 2.8 배 유의적으로 감소하였으며, 48 시간 후에는 약 3.5 배 유의적으로 감소하였다. 반면, 0.1%(w/v) 농도의 FOS와 B-FOS는 처리 후 96시간 까지 LPS만 처리한 군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

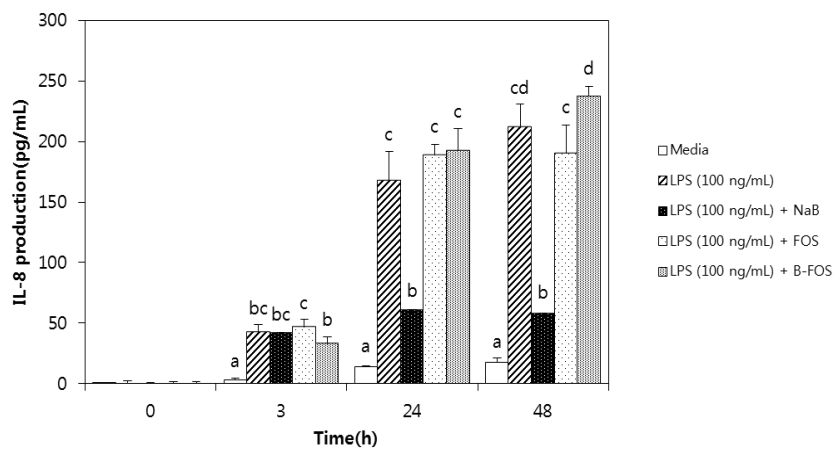


Fig. 13. The production of IL-8 from HT-29 cells cultured in media containing 0.1% (w/v) NaB, FOS, and B-FOS

Data are expressed as means \pm SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences followed by Duncan' s test ($P < 0.05$).

4.10 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부 확인

Glu+pyr+배지와 Glu-pyr- 배지에 FOS와 B-FOS를 첨가하여 AGS 세포를 4일 동안 배양 한 후 배양액을 TLC로 분석한 결과는 Fig. 14에 나타냈으며 배양 전후 밴드의 차이가 없는 것을 확인하였다. 따라서 B-FOS는 대장 상피 세포인 Caco-2 세포와 다르게 위의 상피세포인 AGS 세포에 의해서는 분해되거나 이용되지 않는 것으로 보인다.

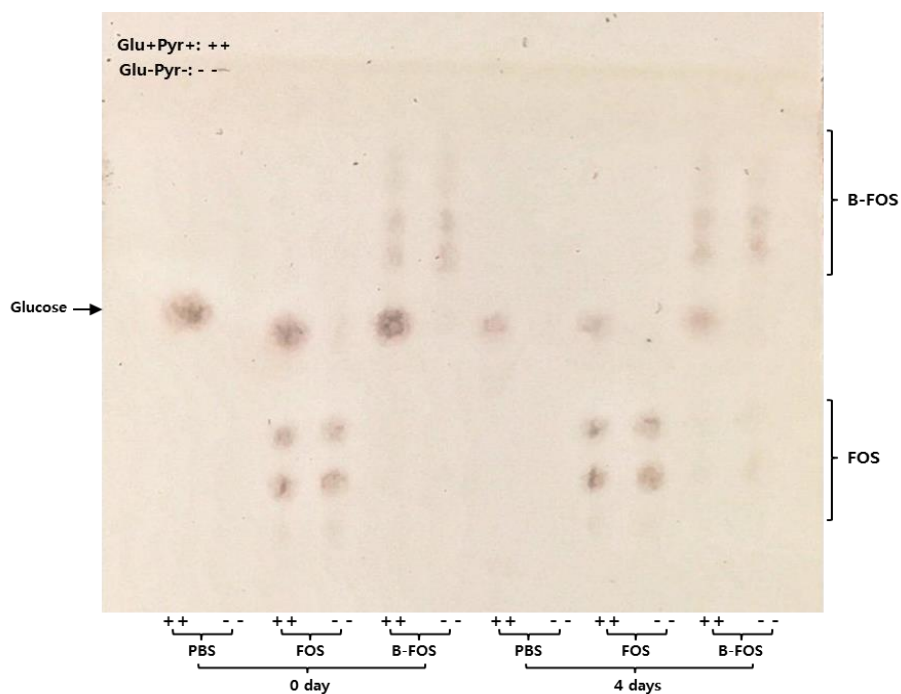


Fig. 14. TLC analysis of the culture supernatant of AGS cells cultured in media containing FOS and B-FOS

‘Glu+Pyr++(++)’ and ‘Glu-Pyr--(--)’ represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

5. 고찰

본 연구에서는 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)을 탄소원이 없는 brain-heart Infusion broth(BHIB)에 첨가하여 장내 세균을 배양했을 때, B-FOS가 다수의 비피도박테리아와 일부 젖산균의 생장을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 또한, B-FOS를 탄소원이 없는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에 첨가하여 Caco-2 세포를 배양했을 때, Caco-2 세포의 증식을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 일정시간마다 장내 세균 배양액의 흡광도 값을 측정한 결과 B-FOS가 존재할 때, 유익균 다수의 최대 OD₆₀₀ 값은 탄소원이 없는 대조군에 비해 유의적으로 높았고 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 또한, 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 실험에 사용된 대다수의 균 생장을 촉진한 반면 B-FOS는 유해균을 포함한 non-probiotic 균주보다 유익균에 의해 더 잘 이용되었다. 이는 배양 전 후 상등액에 존재하는 B-FOS와 대사산물의 분석을 통해서도 확인할 수 있었다. Caco-2 세포의 경우 B-FOS가 첨가된 배지에서 4일 동안 배양 한 결과 세포 수가 유의적으로 증가하였다. B-FOS는 포도당과 피루브산이 존재하지 않는 조건에서 더 잘 이용되었는데 이는 배양 전후 상등액에 존재하는 B-FOS의 분석을 통해 확인할 수 있었다.

장내 미생물 대부분은 탄수화물을 발효함으로써 에너지를 얻는 혐기성 균이며 발효 산물로 유기산을 생성한다 [45]. FOS는 사람의 위와 소장에서 소화되지 않기 때문에 대장에 도달하여 장내 미생물에 의해 이용될 수 있는 올리고당(oligosaccharides)으로 장내에서 비피도박테리아와 락토바실러스의 특정 기질로써 이용된다고 알려져 있다 [46]. 하지만, 그 외의 장내 세균 또한 FOS에 의해 성장률이 증가되며 FOS를 대사하는 데 필요한 운반체(transporter)와 효소인 글리코시다아제(glycosidase)의 생성에 관여하는 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌다 [21, 47]. 이는 본 연구에서

탄소원이 없는 배지에 FOS를 첨가하여 장내 세균의 생장을 비교하였을 때 대다수 균이 잘 성장했던 결과와 일치하며 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 유의적으로 높았으므로 대부분의 장내 세균에 의해 잘 이용되는 것으로 판단된다. 한편, B-FOS는 신규 합성물질로 장내 세균에 의한 이용이 아직 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서 B-FOS가 첨가된 배지에서 배양된 장내 세균의 최대 OD₆₀₀ 값을 비교하였으며 그 결과, 다수의 유익균의 생장은 대조군에 비해 유의적으로 촉진됐지만, 그 외의 대다수 균은 생장에 유의적인 수준으로 영향을 받지 않음을 보였다.

이러한 양상을 나타내는 장내 세균이 B-FOS를 분해 및 발효하여 에너지원으로서 소비하였는지 분석하였다. 발효는 장내 미생물의 대사 작용의 결과로, FOS는 장내 세균에 의해 분해되어 젖산, 초산 등과 같은 유기산으로 발효된다 [48, 49]. 본 연구에서는, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 *Bifidobacterium longum* BORI가, 생장에 유의적인 차이가 없었던 *Enterococcus faecalis*보다 B-FOS를 상대적으로 더 잘 이용했음을 확인할 수 있었다. 또한, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 균주의 배양 상등액에서 젖산, 초산, 부티르산을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 장내 세균은 B-FOS를 대사할 수 있으며, 분해하고 발효함으로써 에너지를 얻어 성장할 수 있음을 유추할 수 있었다.

균에 의한 B-FOS의 가수분해를 좀 더 확인하기 위해 B-FOS를 직접 균체, 균 배양 상등액, 균 파쇄액과 반응시켜보았다. 그 결과, B-FOS가 균체 또는 균 파쇄액과 반응했을 때 FOS와 부티르산이 생성되었다. 따라서 B-FOS를 가수분해하는 요인은 균체의 세포벽 혹은 세포 내에 있는 것으로 사료된다. 선행 연구에 의하면 FOS가 균에 의해 대사되는 분자적인 기전(mechanism)은 아직 완전하게 규명되지는 않았으나 ATP 결합상자 수송체(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) 혹은 phosphotransferase system(PTS)를 통해 세균의 세포 내로 수송된 후

세포질에서 β -1,2 결합을 분해하는 효소인 β -fructofuranosidase 에 가수분해되어 과당과 포도당-6-인산이 생성된다고 보고되었다 [50-53]. 본 연구에서는 B-FOS의 가수분해가 균체 내로 수송된 후 진행된 것인지 아닌지에 관한 기전은 알 수 없다. 하지만, B-FOS가 첨가된 배지에서 균을 배양했을 때, 배양 상등액에서 FOS가 확인 되지 않았던 결과를 통해서 B-FOS의 분해 결과 생성된 FOS는 균이 이용 하였을 것으로 생각된다. 따라서 B-FOS로부터 생성된 FOS와 부티르산이 균의 생장에 영향을 미쳤을 가능성을 제시 할 수 있다. 선행 연구에 의하면, 부티르산은 pH가 4.5와 5.0인 환경에서 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* 균의 생장을 저해하며, 이는 배지에서 이온화하지 않은 부티르산이 세포로 확산되어 세포질의 산성화를 초래하고 세포 내에서 부티르산의 재이온화로 생성되는 양성자로 인해 ATP 합성을 저해함으로써 균의 생장이 억제된 것으로 추정되었다 [25]. 질병을 일으키는 유해균은 낮은 pH에대한 저항성이 강하지 않으므로, 산성화를 초래하는 부티르산은 유해균의 생장을 저해할 수 있다 [54]. 하지만, 프로바이오틱 균주는 낮은 pH에 저항할 수 있기 때문에 [55] 부티르산에 의한 생장의 저해가 유해균에 비해 나타나지 않을 수 있다. 그러므로 본 연구에서 B-FOS가 첨가되었을 때 non-probiotic 균주에 비해 비피도박테리아와 젖산균의 생장이 촉진된 결과에는 B-FOS로부터 분해된 FOS와 부티르산이 기인했을 것으로 사료된다. 비피도박테리아는 짧은 올리고당을 세포 내로 효율적으로 흡수(uptake)하는데 특화되어있어 우선적인 올리고당 대사를 나타내며 세포 외에서 탄수화물을 분해하는 다른 균들에 비해 경쟁적인 이점을 가진다고 보고된 바 있다 [14]. 따라서 장내균이 경쟁적인 환경에 있을 때 혹은 생체 내(*in vivo*)에서 무리 형태로 존재 할 때, B-FOS나 FOS를 특정 기질로 삼는 균의 존재는 장내 균의 생장에 본 연구와는 다른 영향을 미칠 수 있다. 그러므로, 추후 이에 관련한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

부티르산은 장 상피세포의 증식을 촉진하는 효과가 있으며 정상적인 대장 상피세포에서 산화 가능한 연료로서, 선호되는 주요 에너지원으로 잘 알려져 있다 [56-58]. 하지만 B-FOS가 대장세포에서 에너지원으로써 이용되는지는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 대장 상피 세포인 Caco-2 세포를 이용하여 NaB, FOS, B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 대장암 세포주에서 부티르산은 히스톤 탈아세틸효소(histone deacetylase, HDAC)를 억제하고 과아세틸화(hyperacetylation)를 발생시켜 세포의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도한다고 보고되었다 [59]. 하지만, 이는 대체 가능한 에너지원의 존재에 따라 달라지는데, 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재할 때 부티르산은 세포 내에 축적되어 세포사멸을 유도하지만 포도당과 피루브산이 존재하지 않는 조건에서는 낮은 농도의 부티르산은 에너지원으로 이용되어 Caco-2 세포의 성장을 촉진한다는 결과가 관찰된 바 있다 [38]. 이는 본 연구에서 NaB를 첨가한 군의 결과와도 일치하였다. 하지만, B-FOS는 NaB와 달리 세포 수를 감소시키는 현상은 보이지 않았으며, 0.06%(w/v)의 농도에서 세포 수를 유의적으로 증가시켰다. 이는 B-FOS가 Caco-2 세포의 에너지원으로써 이용되어 장 상피세포의 증식을 촉진했음을 의미한다.

대체 가능한 에너지원의 존재에 따른 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 여부를 좀 더 확인하기 위해 배양 상등액의 B-FOS를 분석하였다. 그 결과, 대체 가능한 에너지원이 없을 때 Caco-2 세포에 의해 B-FOS가 상대적으로 더 잘 이용되었으며 더 많은 양의 FOS로 전환된 것을 확인할 수 있었다. Caco-2 세포에 의한 B-FOS의 분해 경로를 확인하기 위해 B-FOS를 직접 Caco-2 세포의 배양 상등액, 세포 파쇄액, 세포 현탁액과 각각 반응시켰다. 그 결과, Caco-2 세포는 군과 달리 B-FOS의 분해에 관여하는 요인이 세포벽 혹은 세포내, 외에 있음을 유추할 수 있었다. 또한, 분해 결과 FOS와 부티르산이 생성되었다. B-FOS가 첨가된 배지에서

Caco-2 세포를 배양했을 때 부티르산이 검출되지 않았던 결과와 비교하여 보면, 배양 시 분해된 부티르산은 배양 과정에서 세포에 의해 이용된 것으로 사료된다.

MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석 결과, B-FOS를 처리했을 때 Caco-2 세포의 생존율은 포도당과 피루브산이 존재하는 조건에서 세포 수를 측정했던 결과와 비슷한 양상을 보였다. 또한, B-FOS는 72 시간까지 0.1%(w/v)의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다. 이러한 시간과 농도 조건을 토대로, B-FOS가 Caco-2 세포의 장벽 기능(intestinal barrier) 및 항염증반응에 미치는 영향을 살펴 보았다. 치밀이음부(tight junction)가 잘 유지되면 점막이 단단하게 부착되어 있어 세포와 세포 사이로 흐르는 전류가 세포 사이를 통과할 때 큰 저항을 발생시키기 때문에 세포 단층의 전기 저항값(trans-epithelial electrical resistance, TEER) 값이 높게 나타난다 [60]. 부티르산은 Caco-2 세포에서 TEER 값의 증가를 촉진 시키며 장벽의 기능(intestinal barrier)을 개선한다고 알려져 있다 [40, 61]. 본 연구에서 NaB의 처리는 이러한 선행 연구와 일치하는 결과를 보였다. 하지만, B-FOS와 FOS는 투과 장벽의 역할을 하는 장점막 세포의 치밀이음부(tight junction)의 온전성(integrity)에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 한편, 부티르산은 세포의 장벽 기능을 개선할 뿐만 아니라, 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)과 같은 사이토카인(cytokine)의 유전자 발현을 감소시키는 NF- κ B의 저해를 통해 항염증 효과를 나타낸다 [62]. 또한, 부티르산과 같은 단쇄지방산이 IL-8 생성에 미치는 영향은 잘 알려져 있다 [63, 64]. 선행 연구에서 부티르산은 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극한 사람의 장 상피세포에서 IL-8의 생성과 mRNA의 발현을 조절하며, IL-8의 하향 조절에 의해 장내 항염증반응에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 [43]. 본 연구에서 NaB의 처리는 선행 연구에서 나타난 바와 같이 LPS로 유도된 Caco-2 세포에서 IL-8의 생성량을 감소시킴으

로써 항염증반응을 나타낸 것으로 사료된다. 하지만, FOS와 B-FOS의 처리는 대조군과 유의적인 차이가 없었으며 IL-8의 발현 조절을 통한 항염증의 반응조절에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 본 연구의 Caco-2 세포를 이용한 실험에서는 B-FOS의 분해가 Caco-2 세포에 의해서만 발생했음을 고려해 볼 수 있다. 하지만, 사람의 장내 생태계는 대장 상피세포 뿐만 아니라 10^{13} - 10^{14} 의 장내 미생물 무리 등과 같은 요소로 구성되어 복잡한 환경을 나타낸다 [62]. 따라서 사람의 대장에서는 본 연구 결과 확인된 장내 균에 의한 B-FOS의 분해 또한 함께 발생할 가능성이 있다. 그러므로 대장에서 B-FOS의 분해 정도와 그에 따라 생성된 부티르산의 농도가 본 연구와 다를 수 있음을 예상할 수 있다. 이에 따라 생체 내(*in vivo*)에서 장 상피세포의 장벽 기능과 항염증 기능에 미치는 B-FOS의 영향과 관련된 추후 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

6 명의 건강한 지원자에게 11 일 동안 FOS를 섭취하게 한 결과 89%가 위와 소장에서 물질대사 되지 않고 대변으로 배출되지 않았으며, 이는 FOS가 대장의 미생물군에 의하여 완전히 발효된 것을 의미한다 [65]. 또한, FOS는 그 양에 비례하여 프리바이오틱스 효과를 나타낸다고 보고되었다 [16]. 본 연구는 생체 외(*in vitro*) 실험으로서 B-FOS가 산성조건(pH 2-4)에서 분해되지 않고 위장 상피 세포인 AGS 세포에 의해서 분해되거나 이용되지 않음을 확인하였지만, 사람의 위장관에서 B-FOS의 소화 및 흡수 여부는 아직 연구되지 않은 상태이다. 장 상피세포는 장 내장의 미생물과 장내 조직 사이의 장벽을 이루고 있으며 장내 미생물 무리는 장점막 표면에 정착하여 점막 조직과 직접적인 접촉을 하고 있다 [66, 67]. 따라서 만일 섭취된 B-FOS가 사람의 소화 효소에 의해 분해되지 않고 모두 대장에 도달한다고 가정했을 때, B-FOS는 장내 세균에 먼저 접촉하여 분해될 가능성을 제시해 볼 수 있다. 하지만, 본 연구에서 B-FOS는 Caco-2 세포 외에서도 분해 될 수 있음을 확인하였으므로 장 점막에 접촉한 B-FOS 또한 분해 될 것이라 생각된다. 결과적으로는, 장내 세균과 장 상

피 세포 모두에 의해서 B-FOS가 분해될 것이라고 예상할 수 있다. 또한, 장내에서 B-FOS의 분해 정도는 장관의 길이와 장관 내 위치하고 있는 미생물무리의 종에 따라 차이가 있을 수 있다. 그러므로 생체 내(*in vivo*)에서 B-FOS의 대사에 따라 나타나는 인체에 미치는 영향에 관하여 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

6. 요약 및 결론

본 연구는 탄소원이 없는 배양 배지에 부티릴 프락토올리고당(butryl-fructooligosaccharides, B-FOS)을 첨가하여 장내 세균 및 Caco-2 세포를 각각 배양한 후 장내 세균과 Caco-2 세포에 의한 B-FOS 이용 여부를 살펴보았다. 또한 탄소원이 없는 대조군, NaB가 첨가된 군, FOS가 첨가된 군을 B-FOS가 첨가된 군과 비교하여 장내 세균과 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 주요 결과를 요약해보면 다음과 같다.

- 1) B-FOS가 존재할 때 군 배양액의 최대 OD₆₀₀값은 비피도박테리아와 젖산균을 포함하는 14 개의 군주 중 4 개의 비피도박테리아와 3 개의 젖산균 군주에서 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 특히, *B. bifidum* BGN4와 *B. longum* BORI, *L. casei*, *S. thermophilus*의 생장은 약 2-5 배로 높았다. Non-probiotics는 10 개 중 6 개의 군주가 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 또한, *S. aureus*와 *C. butyricum*은 NaB가 존재할 때 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 각각 0.3 배, 0.14 배 유의적으로 낮았다.
- 2) 균의 배양 상등액에 존재하는 B-FOS는 *E. faecalis*에 비해 *B. longum* BORI 에서 소비되었음을 보였고, *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B. catenulatum*, *L. casei*에서 B-FOS의 대사산물로서 젖산, 초산, 부티르산이 검출되었다.
- 3) 0.06%(w/v)의 B-FOS가 첨가된 배지에서 배양된 Caco-2 세포의 수는 대조군에 비해 약 1.5-1.7 배 유의적으로 높았다. 0.06%(w/v)의 NaB가 첨가된 군의 경우 세포 수가 약 0.3 배 유의적으로 낮았으며 FOS가 첨가된 군에서는 유의적인 차이가 없었다.
- 4) Caco-2 세포의 배양 상등액에 존재하는 B-FOS는 포도당과 피루브

산이 존재할 때에 비해 존재하지 않았을 때 더 잘 이용됐음을 보였고, 배양 결과 FOS가 생성되었다. 하지만 AGS 세포의 배양 결과에서는 B-FOS의 이용과 FOS의 생성이 확인되지 않았다.

- 5) B-FOS의 분해는 균의 경우 균체의 세포벽과 세포 내에서, Caco-2 세포는 세포벽, 세포 내, 외에서 발생했으며 분해 결과 FOS와 부티르산이 생성되었다.

이상의 결과를 통해 신규 합성물질인 B-FOS는 유익균의 성장을 촉진하며 유익균에 의해 소비되어 대사산물로서 젖산, 초산, 부티르산을 생성함을 확인할 수 있었다. 반면, 유해균을 포함한 non-probiotic 균주의 성장에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. B-FOS는 균체의 세포벽 혹은 세포 내에서 분해되어 FOS와 부티르산을 생성하는데 이에 따라 생성된 FOS와 부티르산은 세균의 성장을 저해하거나 촉진하는데 영향을 미쳤음을 유추할 수 있었다. 또한, B-FOS는 Caco-2 세포의 증식을 촉진하며, 이는 B-FOS가 Caco-2 세포의 세포벽 혹은 세포 내, 외에서 분해되어 FOS와 부티르산을 생성하고 생성된 부티르산이 Caco-2 세포의 에너지원으로 사용되었음을 유추할 수 있었다.

7. 참고문헌

1. Kim JM: Roles of enteric microbial composition and metabolism in health and diseases. *Korean Journal of Gastroenterology* 2013, **62**:191–205.
2. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley E: Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology and Motility* 2013, **25**:4–15.
3. Myers SP: The causes of intestinal dysbiosis: a review. *A Journal of Clinical Therapeutics* 2004, **9**:180–197.
4. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E: Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2017, **17**:219–232.
5. Olesen SW, Alm EJ: Dysbiosis is not an answer. *Nature Microbiology* 2016, **1**:16228.
6. Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F: Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: a review. *Journal of Functional Foods* 2016, **25**:511–522.
7. Hotel ACP, Cordoba A: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention* 2001, **5**:37–50.
8. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR: Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, **8**:692–700.
9. Kang CH, Kim YG, Han SH, Jeong Y, Paek NS: Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria from Korean intestine origin. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 2017, **32**:153–159.
10. Collins MD, Gibson GR: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1999, **69**:1052–1057.
11. Salminen S, Von Wright A (Eds.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *CRC Press* 2004.
12. Yoon JA, Shin KO: Studies on the function of lactic acid bacteria and related yeasts in probiotics: a review. *The Korean*

- Society of Food and Nutrition* 2017, **30**:395–404.
13. Lee SE: Effect of novel propionyl–fructooligosaccharides on growth of intestinal bacteria. *Graduate School of Seoul National University* 2017, 1–34.
 14. Riviere A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L: Bifidobacteria and butyrate–producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology* 2016, **7**:979.
 15. Takemura N, Ozawa K, Kimura N, Watanabe J, Sonoyama K: Inulin–type fructans stimulated the growth of exogenously administered *Lactobacillus plantarum* NO. 14 in the mouse gastrointestinal tract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2010, **74**:375–381.
 16. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourié B, Bornet F, Rambaud J–C: Short–chain fructo–oligosaccharide administration dose–dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *The Journal of Nutrition* 1999, **129**:113–116.
 17. Mei G–Y, Carey CM, Tosh S, Kostrzynska M: Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology* 2011, **57**:857–865.
 18. Bruno–Barcena JM, Azcarate–Peril MA: Galacto–oligosaccharides and colorectal cancer: feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods* 2015, **12**:92–108.
 19. Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C: Prolonged intake of fructo–oligosaccharides induces a short–term elevation of lactic acid–producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *The Journal of Nutrition* 1999, **129**:2231–2235.
 20. Rao VA: The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research* 2001, **21**:843–848.
 21. Hartemink R, Van Laere K, Rombouts F: Growth of enterobacteria on fructo–oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 1997, **83**:367–374.
 22. Mikkelsen LL, Knudsen KEB, Jensen BB: In vitro fermentation of fructo–oligosaccharides and transgalacto–oligosaccharides by adapted and unadapted bacterial populations from the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 2004, **116**:225–238.
 23. Bovee–Oudenhoven I, Ten Bruggencate S, Lettink–Wissink M, Van der Meer R: Dietary fructo–oligosaccharides and lactulose

- inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *Salmonella* in rats. *Journal of the British Society of Gastroenterology* 2003, **52**:1572–1578.
24. Załęski A, Banaszkiewicz A, Walkowiak J: Butyric acid in irritable bowel syndrome. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2013, **8**:350.
 25. Sun CQ, O'Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM: The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. *Chemico Biological Interactions* 1998, **113**:117–131.
 26. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost F, Brummer RJ: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2008, **27**:104–119.
 27. Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL: Butyrate and the colonocyte. *Digestive Diseases and Sciences* 1996, **41**:727–739.
 28. Borycka–Kiciak K, Banasiewicz T, Rydzewska G: Butyric acid—a well-known molecule revisited. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2017, **12**:83.
 29. Carroll K: Digestibility of individual fatty acids in the rat. *Journal of Nutrition* 1958, **64**:399–410.
 30. Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, Di Giulio E, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A: Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2000, **45**:976–981.
 31. Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, d'Incà R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D: Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *European Journal of Clinical Investigation* 2003, **33**:244–248.
 32. Banasiewicz T, Krokowicz Ł, Stojcev Z, Kaczmarek B.F, Kaczmarek E, Maik J, Marciniak R, Krokowicz P, Walkowiak J, Drews M: Microencapsulated sodium butyrate reduces the frequency of abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome. *Colorectal Disease* 2013, **15**:204–209.
 33. Deschner E, Ruperto J, Lupton J, Newmark H: Dietary butyrate (tributyryn) does not enhance AOM-induced colon

- tumorigenesis. *Cancer Letters* 1990, **52**:79–82.
34. Lee JM: Preparation of fucose-containing monosaccharides from *Undaria pinnatifida* sporophyll and synthesis of fucosylated oligosaccharide using *Bifidobacterium longum* RD47. *Graduate School of Seoul National University* 2015, 1–34.
 35. Hwang JE: Synthesis of fucosylated oligosaccharides using crude enzyme extracts from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD 47. *Graduate School of Seoul National University* 2014, 1–56.
 36. Vigsnaes LK, Nakai H, Hemmingsen L, Andersen JM, Lahtinen SJ, Rasmussen LE, Hachem MA, Petersen BO, Duus JØ, Meyer AS: In vitro growth of four individual human gut bacteria on oligosaccharides produced by chemoenzymatic synthesis. *Food and Function* 2013, **4**:784–793.
 37. Hoseinifar S, Mirvaghefi A, Amoozegar M, Merrifield D, Ringø E: In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 2017, **23**:111–118.
 38. Singh B, Halestrap AP, Paraskeva C: Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 1997, **18**:1265–1270.
 39. Dzierzewicz Z, Orchel A, Weglarz L, Latocha M, Wilczok T: Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco-2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochimica Polonica* 2001, **49**:211–220.
 40. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J: Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Journal of Pediatrics* 2007, **61**:37–41.
 41. Matter K, Balda MS: Functional analysis of tight junctions. *Methods* 2003, **30**:228–234.
 42. Eckmann L, Kagnoff M, Falco M: Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 1994, **82**:505.
 43. Asarat M, Vasiljevic T, Apostolopoulos V, Donkor O: Short-chain fatty acids regulate secretion of IL-8 from human intestinal epithelial cell lines in vitro. *Immunological Investigations* 2015, **44**:678–693.

44. Kim J, Shin E, Park H: Fructooligosaccharides decreased the ability of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 to adhere to co-cultures of human intestinal cell lines. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2015, **58**:45–52.
45. Miller TL, Wolin M: Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1979, **32**:164–172.
46. Sabater–Molina M, Larqué E, Torrella F, Zamora S: Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2009, **65**:315–328.
47. Mao B, Li D, Zhao J, Liu X, Gu Z, Chen YQ, Zhang H, Chen W: In vitro fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. *Food and Function* 2015, **6**:947–954.
48. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**:6150–6158.
49. Bornet FR, Brouns F, Tashiro Y, Duvillier V: Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease* 2002, **34**:111–120.
50. de Mesquita ARC, da Mota Silveira LP, da Cruz Filho IJ, de Lima VF, da Mota Silveira Filho V, Araujo AA, da Silva TL, de Freitas Araújo K, da Silva Macedo L: Metabolism and physiology of lactobacilli: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress* 2017, **2**:115–124.
51. Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate–Peril MA, Altermann E: Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 2005, **29**:393–409.
52. Goh YJ, Lee J–H, Hutkins RW: Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**:5716–5724.
53. Chen C, Zhao G, Chen W, Guo B: Metabolism of fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST–III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. *Applied and Environmental Microbiology* 2015, **81**:7697–7707.

54. Bergeim O, Hanszen A, Pincussen L, Weiss E: Relation of volatile fatty acids and hydrogen sulphide to the intestinal flora. *The Journal of Infectious Diseases* 1941, **69**:155–166.
55. Kaplan H, Hutkins RW: Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**:2682–2684.
56. Sakata T: Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition* 1987, **58**:95–103.
57. Roediger W: Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *British Society of Gastroenterology* 1980, **21**:793–798.
58. Hague A, Butt AJ, Paraskeva C: The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *Proceedings of the Nutrition Society* 2007, **55**:937–943.
59. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Glei M: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009, **682**:39–53.
60. Lee SJ, Lee MJ, Jung JE, Kim HJ: In vitro profiling of bacterial influence and herbal applications of *Loniceræ* flos on the permeability of intestinal epithelial cells. *The Korean Society of Food and Nutrition* 2012, **41**:881–887.
61. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J: Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition* 2009, **139**:1619–1625.
62. Sossai P: Butyric acid: what is the future for this old substance? *Swiss Medical Weekly* 2012, **142**:13596.
63. Weber TE, Kerr BJ: Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, **113**:139–147.
64. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK: Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through

- coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infection and Immunity* 2003, **71**:3503–3511.
65. Molis C, Flourie B, Ouarne F, Gailing M-F, Lartigue S, Guibert A, Bornet F, Galmiche J: Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1996, **64**:324–328.
66. Bron PA, Van Baarlen P, Kleerebezem M: Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology* 2012, **10**:66–78.
67. Kim JM: Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. *The Korean Journal of Gastroenterology* 2010, **55**:4–18.

Abstract

Utilization of Butyryl-fructooligosaccharides by Intestinal Bacteria and Caco-2 Cell and The Effects of Butyryl-fructooligosaccharides on the Growth of Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells

Um Min Hee

Department of Food & Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Fructo-oligosaccharides(FOS) are widely used as health functional food ingredients. They stimulate the growth of bifidobacteria and lactobacillus and modify the composition of the intestinal microbiota. Butyric acid is a principal energy source of intestinal epithelial cells. It may improve the intestinal barrier function and exert anti-inflammatory activity. Recently, butyryl-fructooligosaccharides(B-FOS) were synthesized from FOS and butyric acid. This is the first study to show the hydrolysis and utilization of B-FOS for the growth of intestinal bacteria and Caco-2 cells. For this purpose, B-FOS were added to dextrose free brain-heart Infusion broth(BHIB) and Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) without glucose and pyruvate to culture bacteria and Caco-2 cells, respectively. The availabilities of B-FOS by various bacteria and Caco-2 cells were confirmed by thin layer chromatography(TLC) and high performance liquid chromatography(HPLC). The effects of B-FOS on the growth of bacteria and Caco-2 cells were evaluated by comparing groups each containing sodium butyrate(NaB), FOS, and phosphate buffer saline(PBS) (as a control) with group containing B-FOS. In addition, the integrity of tight junctions in Caco-2 cells was assessed by trans-epithelial electrical resistance(TEER) and the production of IL-8 in HT-29 cells stimulated by lipopolysaccharides(LPS) was measured using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). As a

result, B-FOS significantly increased the growth of the most of the bifidobacteria and some lactic acid bacteria (LAB). On the other hand, the growth of the most of the non-probiotics was similar to that of the control. It was confirmed that B-FOS was consumed by *Bifidobacterium longum* BORI, which showed the excellent growth in B-FOS medium. Moreover, the lactic acid, acetic acid, and butyric acid were detected in the culture media of *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, and *B. catenulatum* KCTC 3221. This suggests that B-FOS can be used as a good carbon source by beneficial bacteria. In Caco-2 cells, B-FOS were used well for the growth of Caco-2 cells and converted to FOS especially in the DMEM without glucose and pyruvate. The TEER value of Caco-2 cells and the amount of IL-8 in HT-29 cells stimulated by LPS were not affected by B-FOS. When B-FOS were directly reacted with each of culture supernatants, cell suspensions, and cell extracts of the experimental bacteria and of Caco-2 cells, FOS and butyric acid were detected in both the cell suspension and cell extract of the bacteria, whereas they were found in all of the culture supernatant, cell suspension, and cell extract of Caco-2 cells. However, after the incubation of bacteria in the B-FOS medium, the FOS were not detected. Also, butyric acid was not detected after the incubation of Caco-2 cells in the B-FOS medium. This suggests that the FOS and butyric acid can be used by bacteria and Caco-2 cells, respectively. It means that B-FOS can promote the intestinal bacterial growth and proliferation of Caco-2 cells. Taken altogether, this study suggests that B-FOS may play a role in the regulation of intestinal microbiota by promoting the selective growth of probiotics and contribute to the physiological functions of intestinal epithelial cells as an energy source.

Key words: Fructo-oligosaccharides, Butyric acid, Intestinal epithelial cell, Bacterial growth, Butyryl-fructooligosaccharide

Student number: 2016-21667



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생 활 과 학 석 사 학 위 논 문

장내 세균 및 Caco-2 세포에 의한
부티릴 프락토올리고당의 이용과
부티릴 프락토올리고당이
장내 세균 및 Caco-2 세포의
생장에 미치는 영향

Utilization of Butyryl-fructooligosaccharides by
Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells and
The Effects of Butyryl-fructooligosaccharides on
the Growth of Intestinal Bacteria
and Caco-2 Cells

2018년 2월

서 울 대 학 교 대 학 원
식 품 영 양 학 과
엄 민 희

국문초록

프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 장내 미생물인 비피도박테리아와 락토바실러스의 성장을 자극하여 장내 균총을 개선할 수 있기 때문에 건강 기능성 원료로 사용되고 있다. 부티르산(butyric acid)은 대장 상피 세포의 주요 에너지원으로 장점막의 장벽기능 개선 효과와 항염증 효과에 대한 연구가 보고된 바 있다. 최근, FOS와 부티르산을 합성한 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)이 만들어졌다. 본 연구에서는 B-FOS가 장내 세균 및 Caco-2 세포 각각에 의해 분해되거나 이용되는지를 알아보고 B-FOS가 장내 세균 및 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 위하여, B-FOS를 탄소원이 없는 배양 배지에 첨가하여 장내 세균과 Caco-2 세포를 각각 배양하였다. B-FOS의 이용은 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 통해 확인 하였다. 또한, 인산 완충 용액(phosphate buffer saline, PBS)을 첨가한 대조군과 나트륨 부티레이트(NaB)를 첨가한 군, FOS를 첨가한 군을 B-FOS를 첨가한 군과 비교하여 장내 세균과 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 평가하였다. 더불어, Caco-2 세포 단층의 전기저항 값 측정과 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8) 양을 측정함으로써 B-FOS가 장 상피세포의 장벽기능 및 항염증반응에 미치는 영향을 분석하였다. 실험 결과, B-FOS는 다수의 비피도박테리아와 일부 젖산균의 성장을 유의적으로 증가시켰고, 다수의 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 특히, B-FOS가 첨가되었을 때 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 약 1.8 배 증가했던 *Bifidobacterium longum* BORI의 배양 상등액에서 B-FOS가 소모되었음을 확인 하였다. 또한, *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B.*

catenulatum KCTC 3221에서 B-FOS의 대사산물로 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid), 부티르산이 검출되었다. 이는 B-FOS가 탄소원으로써 유익균에 의해 잘 이용될 수 있음을 의미한다. 더불어, B-FOS는 Caco-2 세포의 증식을 유의적으로 증가시켰고 FOS로 전환되었다. 특히 포도당과 피루브산이 없는 배지에서 약 1.7 배 세포의 증식을 증가시켰다. 한편, Caco-2 세포 단층의 전기 저항값과 LPS로 자극된 HT-29 세포의 IL-8 생성량은 B-FOS를 처리한 군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었다. B-FOS가 장내 세균과 Caco-2 세포 각각의 배양 상등액, 세포체, 세포 파쇄액과 직접 반응했을 때, 균은 균체의 세포벽과 세포 내에서, Caco-2 세포는 세포벽, 세포 내, 외에서 B-FOS를 분해하여 FOS와 부티르산을 생성함을 확인할 수 있었다. 하지만, B-FOS를 함유한 배지에 장내 세균을 배양 했을 때 FOS는 확인되지 않았으며, Caco-2 세포를 배양했을 때 부티르산은 확인되지 않았다. 이를 통해 FOS는 장내 세균에 의해, 부티르산은 Caco-2 세포에 의해 이용되었음을 유추할 수 있었다. 이는 B-FOS가 장내 세균의 성장과 Caco-2 세포의 증식을 촉진하는 데 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 이와 같은 결과에 근거했을 때, 본 연구는 B-FOS가 대장 내에 도달한다면, 장 내강에 서식하는 균과 장 상피 세포에 의해 분해되어 FOS와 부티르산으로 전환된 후 유익균의 성장을 촉진함으로써 장내 미생물 군집의 조절에 대한 역할을 할 수 있으며 장 상피세포의 에너지원으로써 이용되어 대장의 생리적 기능에 기여 할 수 있다는 가능성을 제시한다.

주요어: 프락토올리고당(Fructo-oligosaccharides), 부티르산(butyric acid), 장 상피 세포, 장내 미생물 성장, 부티릴 프락토올리고당(Butyryl-fructooligosaccharides)

학번: 2016-21667

목차

국문초록	i
목차	iii
그림목차	vi
표목차.....	vii
약어요약	viii
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1 재료	4
2.1.1 부티릴 프락토올리고당 (butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS) 의 출처	4
2.1.2 박테리아 균주와 배양 조건	4
2.1.3 세포 배양	6
2.1.4 화학 물질 및 시약	6
2.2 B-FOS의 정제 및 준비	6
2.3 산성 및 열처리 조건에서 B-FOS의 변화	7
2.4 B-FOS가 장내 미생물 생장에 미치는 영향	7
2.4.1 실험 배지 제조	7
2.4.2 미생물의 생장곡선 측정	8
2.5 박층크로마토그래피 (thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액 체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)를 통한 장내 균의 B-FOS 이용 확인	8
2.5.1 균 배양액의 TLC 및 HPLC	8
2.5.2 B-FOS와 균 배양액, 균체, 균체 파쇄액의 반응	11

2.6 B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향	1 1
2.6.1 실험 배지 제조	1 1
2.6.2 Trypan blue 색소 배제법 (dye exclusion assay)을 통한 Caco-2 세포의 수 측정	1 2
2.7 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해 여부	1 2
2.7.1 Caco2 세포 배양액의 TLC 및 HPLC	1 2
2.7.2 B-FOS와 세포 배양액, 세포, 세포 파쇄액의 반응	1 2
2.8 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석에 의한 세포 생존율 측정	1 3
2.9 전기 저항값(Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER) 측정	1 3
2.10 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 처리한 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량 측정	1 4
2.11 위장 상피세포주인 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부	1 4
3. 통계처리	1 5
4. 결과	1 6
4.1 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 정제 결과	1 6
4.2 산과 열처리에서 B-FOS의 안정성	1 6
4.3 나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), FOS, B-FOS, 포도당이 장내 세균의 생장에 미치는 영향	1 9
4.4 장내 균의 B-FOS 이용 및 분해	2 7
4.4.1 배지의 탄소원 종류에 따른 균 배양 상등액 분석	2 7
4.4.2 B-FOS와 균 배양 상등액, 균체, 균체 파쇄액의 반응 결과	3 0
4.5. 배지 구성에 따른 Caco-2 세포 생장의 변화.....	3 3

4.6 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해	3 5
4.6.1 Caco-2 세포 배양 상등액의 TLC 및 HPLC.....	3 5
4.6.2 B-FOS와 Caco-2 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액 의 반응 결과.....	3 5
4.7 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석	3 8
4.8 전기 저항값(Trans-epithelial electrical resistance, TEER) 측정	4 0
4.9 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량	4 2
4.10 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부 확인	4 4
5. 고찰	4 6
6. 요약 및 결론	5 3
7. 참고문헌	5 5
Abstract	6 2

그림목차

Fig. 1. Determination of butyryl-fructooligosaccharides during purification by TLC.....	1 7
Fig. 2. Assessment of stability of B-FOS by TLC.....	1 8
Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients	2 1
Fig. 4. Growth curve of lactic acid bacterial strains in media containing different ingredients	2 3
Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients	2 4
Fig. 6. TLC analysis of culture supernatants of <i>B. longum</i> BORI and <i>E. faecalis</i> cultured in medium with different carbon source	2 8
Fig. 7. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by bacteria	3 1
Fig. 8. Change in the number of Caco-2 cells depending on the presence of glucose and pyruvate.....	3 4
Fig. 9. TLC analysis of the culture supernatants of Caco-2 cells cultured for 4 days in media with FOS and B-FOS.....	3 6
Fig. 10. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by Caco-2 cells.....	3 7
Fig. 11. MTT assays of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS.....	3 9
Fig. 12. TEER values of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS.....	4 1
Fig. 13. The production of IL-8 from HT-29 cells cultured in media containing 0.1%(w/v) NaB, FOS, and B-FOS	4 3
Fig. 14. TLC analysis of the culture supernatant of AGS cells cultured in media containing FOS and B-FOS	4 5

표목차

Table 1. List of the experimental bacterial strains.....	5
Table 2. Conditions of HPLC for analysis of lactic acid, acetic acid, and butyric acid.....	1 0
Table 3. Maximum growth(OD ₆₀₀ nm) of bacteria cultured in media containing different ingredients at 37℃ under anaerobic conditions.....	2 6
Table 4. Detection of organic acids in culture supernatants of bacteria cultured in media containing different ingredients.....	2 9
Table 5. Detection of butyric acid by HPLC after the reaction of B- FOS with cell suspensions, culture supernatant, and cell extracts	3 2

약어 요약

B-FOS; Butyryl-fructooligosaccharides

FOS; Fructo-oligosaccharides

NaB; Sodium butyrate

Glu; Glucose

DI water; Deionized water

LAB; Lactic acid bacteria

BHIB; Brain-heart infusion broth

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

TLC; Thin-layer chromatography

HPLC; High performance liquid chromatography

SCFA; Short chain fatty acids

TEER; Trans-epithelial electrical resistance

IL-8; Interleukin-8

1. 서론

사람의 위장(gastrointestinal track, GI) 내에는 수많은 미생물이 군집을 이루어 서식하고 있으며 이와 같은 집단을 장내미생물무리(enteric microbiota)라고 한다 [1]. 이들은 장관 내부의 생태계를 구성하면서 면역 기능, 소화 및 신진대사에 있어서 중요한 역할을 하기 때문에 정상적인 위장의 생리와 기능에 필수적이다 [2]. 사람의 장내미생물무리는 환경 변화에 상당히 저항적이지만 항생제, 스트레스, 식이 혹은 특정 질병 등과 같은 요인은 장내미생물무리의 변화를 초래한다 [3]. 장내미생물무리의 구성과 기능의 변화를 디스바이오시스(dysbiosis)라고 하며 가장 일반적인 정의는 비피도박테리아, 락토바실러스와 같은 유익균과 *Escherichia coli*와 같은 유해균의 불균형을 말한다 [4, 5]. 이러한 불균형은 자가 면역 질환, 염증성 장 질환, 비만 등과 같은 다양한 질병들과 직간접적으로 연관되어 있다고 알려져 있다 [6].

프로바이오틱스(probiotics)는 사람의 장내미생물무리의 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 살아있는 미생물을 의미한다 [7]. 이들은 단쇄 지방산(short chain fatty acids, SCFA)의 생산에 의한 장내 pH 감소 및 장내 영양소와 장벽 부착 부위에 대한 경쟁을 통해 유해균의 성장을 저해한다 [8]. 또한, 면역 활성화 작용, 유당불내증의 경감 등 인체에 유익한 기능을 한다고 알려져 있다 [9]. 프로바이오틱스로 사용되고 있는 대표적인 미생물로는 비피도박테리아와 젖산균(lactic acid bacteria, LAB)에 속하는 균이 있다 [10]. 젖산균은 탄수화물을 발효시켜 젖산을 생성하는 균으로 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*과 같은 속이 포함된다 [11]. 한편, 비피도박테리아는 다양한 올리고당을 에너지원으로써 이용하는 균이며 육탄당을 젖산이나 초산으로 바꾸는 과정에서 과당-6-인산포스포케톨라아제(fructose-6-phosphate phosphoketolase)라는 효소가 작용하고 발효 과정에서 기체를 생성하지 않는다는 독특한 특징을 가지고 있다 [12]. *Actinobacteria* 강 *Actinobacteria* 목에 속하는 비피도박테리

움(*Bifidobacterium*)의 계통 분류 차이를 고려하여 본 연구에서는 젖산균(LAB)과 비피도박테리아를 구분하였다 [13].

프리바이오틱스는 사람에 의해 소화되지 않으며 장내 미생물에 의해 선택적으로 발효되어 이들의 성장과 대사 변화를 조절함으로써 숙주의 건강에 도움을 주는 물질을 의미한다 [10]. 그중 하나인 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 설탕에 과당분자가 β -1, 2로 결합한 형태의 올리고당이다 [14]. FOS는 락토바실러스와 비피도박테리아에 의해 발효가 가능하며 FOS의 섭취는 비피도박테리움과 락토바실러스 종들을 증가시킨다고 알려져 있다 [15-18]. 동물 실험에서는 쥐가 2 주, 8 주, 27 주 동안 저섬유질의 음식을 섭취하였을 때 보다 같은 식이에 9%의 FOS를 포함한 음식을 섭취하였을 때 락토바실러스가 증가했다고 보고된 바 있다 [19]. 또한, 임상 시험에서는 건강한 사람에게 매일 5 g의 FOS를 섭취하게 했을 때 비피도박테리아가 증가한 결과를 보였다 [20]. 하지만, FOS는 *Clostridium butyricum*, *Enterobacter cloacae* 및 병원성 *Escherichia coli* 균주 등 다른 장내 미생물 및 유해균에 의해서도 대사될 수 있음이 밝혀졌다 [13, 21, 22]. 또한, FOS의 섭취가 쥐에서 *Salmonella*의 전좌(translocation)를 증가시키며 특정한 경우에 FOS가 숙주에게 악영향을 줄 수 있다는 연구 결과가 보고 된 바 있다 [23]. 이러한 선행연구의 결과들에 의하면 FOS는 장내 프로바이오틱스 균주를 증가시켜 사람에게 유익한 작용을 할 수 있지만, 장내 FOS의 대사가 가능한 유해균 및 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)에 의해 역효과가 나타날 수도 있음을 알 수 있다.

한편, 장내 미생물의 발효 산물 중 하나인 부티르산은 단쇄지방산에 속하며 장 내에서 대장세포의 증식과 세포사멸, 위장관의 운동성(motility) 및 장내미생물무리의 구성에 중요한 조절자로서 역할을 한다고 알려져 있다 [24]. 하지만, 부티르산은 불쾌한 냄새 때문에 다른 지방산에 비해 향균작용의 관점에서는 관심을 덜 받아왔다. 선행 연구에 의하면 부티르산은 pH

가 4.5와 5인 환경에서 *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* 등 미생물의 성장을 저해하거나 완전히 저지한다고 보고되었다 [25]. 이와 함께, 부티르산은 대장 상피세포의 주요 에너지원으로써 사용되며 장 상피세포의 투과성을 감소시키고 치밀이음부(tight junction) 단백질, 뮤신(mucin) 등의 생성을 자극하여 외부로부터 침입하는 항원에 대한 장벽 기능을 향상시킨다 [14, 26, 27]. 더불어 면역반응과 관련된 사이토카인(cytokine) 분비를 조절하는 항염증 기능에 관여한다고 보고된 바 있다 [6]. 이뿐만 아니라, 부티르산은 대장에서 중요한 음이온으로서도 작용하여 전해질의 흡수 조절을 통해 설사성 장애를 예방할 수 있으며 과민성 대장 증후군 및 염증성 장 질환에 치료 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 [24, 28]. 하지만 선행 연구에 의하면 섭취를 통한 단쇄지방산은 장쇄지방산(long chain fatty acids)과 달리 물에 대해 높은 용해도를 가지고 있어 소화관의 상부에서 확산과 능동수송을 통해 빠르게 흡수되기 때문에 대장에서의 긍정적 효과를 보기 어렵다고 알려져 있다 [29]. 이에 따라 부티르산은 섭취했을 때보다 관장했을 때 염증성 장 질환에서 유의적인 개선 효과가 나타난 것으로 보고되었다 [30, 31]. 하지만, 자극적인 냄새를 가지고 있는 순수한 부티르산의 임상적인 유용성은 여전히 한계점을 가지고 있어 부티르산을 캡슐화 또는 에스테르화된 전구체(tributylin) 등 다양한 형태로 제조하여 동물 및 사람에게 적용하려는 연구가 시도되고 있다 [32, 33].

최근, 이러한 FOS와 부티르산을 합성한 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)이라는 신규 물질이 만들어졌다. B-FOS는 FOS와 부티르산 각각의 단점을 보완하여 장 내에서 다양한 역할을 할 것이라고 기대된다. 하지만, B-FOS의 작용에 대하여 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 B-FOS에 대한 첫 번째 연구로서 장내 세균과 장 상피세포에 의한 B-FOS의 이용을 확인하고 B-FOS가 장내 세균 및 장 상피세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 출처

B-FOS는 (주)비피도(Hongcheon, Korea)에서 제조된 것을 공급받았다.

2.1.2 박테리아 균주와 배양 조건

본 연구에서 사용된 박테리아 균주는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 서울대학교 식품 미생물 연구실로부터 제공되었다. 비피도박테리아 8 개 균주와 젖산균인 락토바실러스 균주 4 개, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC 2013, *Streptococcus thermophilus* KCTC 3779는 0.05% (w/v)의 L-cysteine · HCl이 첨가된 de-Mann-Rogosa-Sharpe broth(MRS) (Difco, Detroit, USA) 에서 37℃, 18 시간 마다 2 회 계대배양 후 사용하였다. 그 외 균주는 brain-heart infusion broth(BHIB) (Difco)에서 같은 배양 조건으로 계대배양 후 사용하였다.

Table 1. List of the experimental bacterial strains

Test strains	Abbreviation
Bifidobacteria	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	<i>B. bifidum</i> BGN4
<i>B. longum</i> BORI	<i>B. longum</i> BORI
<i>B. catenulatum</i> KCTC 3221	<i>B. catenulatum</i>
<i>B. animalis</i> KCTC 3219	<i>B. animalis</i>
<i>B. adolescentis</i> KCTC 3216	<i>B. adolescentis</i>
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> RD47	<i>B. longum</i> RD47
<i>B. longum</i> RD72	<i>B. longum</i> RD72
<i>B. thermophilum</i> KCCM 12097	<i>B. thermophilum</i>
Lactic acid bacteria	
<i>Lactobacillus casei</i> KFRI 699	<i>L. casei</i>
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3168	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. plantarum</i> KFRI 708	<i>L. plantarum</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KCTC 3635	<i>L. bulgaricus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 2013	<i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 3779	<i>S. thermophilus</i>
Non-probiotic bacteria	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 10115	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ACTC 6358	<i>S. aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	<i>E. coli</i>
<i>Clostridium butyricum</i> KCTC 1871	<i>C. butyricum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3511	<i>E. faecalis</i>
<i>Prevotella intermedia</i> KCTC 5694	<i>P. intermedia</i>
<i>Clostridium ramosum</i> KCTC 3323	<i>C. ramosum</i>
<i>Escherichia coli</i> DH 5 α	<i>E. coli</i> DH 5 α
<i>Clostridium perfringens</i> KCTC 3269	<i>C. perfringens</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> KCTC 5015	<i>Bac. Thetaiotaomicron</i>

2.1.3 세포 배양

모든 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 사람의 대장암 세포주인 Caco-2(KCLB 30037.1) 세포와 HT-29(KCLB 30038) 세포는 10%(v/v) 우태아 혈청과 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 4.5 g/L 포도당)에서 37℃, 5% CO₂ 환경을 유지하며 5% CO₂ 세포배양기(MCO-18AIC, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 배양되었다. 인체 위암 세포주인 AGS 세포(KCLB 21739)는 RPMI-1640(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 Caco-2 세포와 같은 조건으로 배양하였다.

2.1.4 화학 물질 및 시약

모든 화학물질 및 시약은 시그마 알드리치(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 아닌 경우에는 구체적으로 명시하였다.

2.2 B-FOS의 정제 및 준비

B-FOS의 정제는 흡착제인 Diaion HP20(Mitsubishi, Tokyo, Japan)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다. 50 × 5 cm의 Glass Econo-Column(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 정량의 Diaion HP20을 충전한 후 에탄올 용액과 3차 증류수로 세정하였다. 정제되지 않은 B-FOS 용액을 3차 증류수로 4 배 희석하여 로딩한 후 0-70%(v/v) 농도의 에탄올 수용액으로 용리하였다. 0-20%(v/v) 에탄올 수용액에 용리된 용액은 제외하고 30-70%(v/v) 에탄올 수용액에 용리된 부분을 수집했다 [13]. B-FOS의 정제는 박층크로마토그래피(TLC)로 확인하였다. 전개 용매로는 1-프로판올/3차 증류수/에틸 아세테이트(7:2:1, v/v)로 하여 정제된 B-FOS를 실리카겔 플레이트 60 F254(Merck, Darmstadt, Germany)에 점적했다. 발색시약으로 황산/에탄올(1:9, v/v) 용액을 플레이트에 분무한 후 110℃ 건조 오븐에서 10 분 동안 가열하였다 [34, 35]. 이후의 실험에서 사용된 TLC는 모두 이와 같은 방법으로 수행하였다. 정제된 B-

FOS는 고속진공농축기 ScanSpeed 40(Labogene, Lyngø, Denmark)로 농축하여 동결 건조기(Ilshin biobase, Yangju, Korea)로 동결 건조 시켰다 [13].

2.3 산성 및 열처리 조건에서 B-FOS의 변화

산성 조건에서의 B-FOS 분해 여부 확인을 위해 1 N 염산 용액으로 pH가 2, 3, 4로 조정된 인산 완충 용액(phosphate buffer saline, PBS) (900 μl)과 10%(w/v) B-FOS 용액(100 μl)을 실온에서 30 분, 1 시간, 3 시간 반응 시켰다. 열에 의한 분해 여부를 확인하기 위한 방법으로는 1%(w/v)의 B-FOS 용액 1 mL를 끓는 물에 15 분 열처리 하여 분해 여부를 확인하였다. B-FOS의 분해 여부는 TLC를 통해 확인하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다.

2.4 B-FOS가 장내 미생물 생장에 미치는 영향

나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), 프락토올리고당(FOS), 부티릴 프락토올리고당(B-FOS), 포도당(glucose)이 장내 세균의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, Louise *et al.* [36] 에 서술된 방법을 변형하여 수행하였다.

2.4.1 실험 배지 제조

균 성장 실험에 사용된 기본 배지는 당이 없는 BHIB(MB Cell, Los Angeles, CA, USA)이다. 기본 배지에 PBS와 NaB, FOS(BIFIDO), 포도당을 각각 첨가하여 B-FOS를 첨가한 배지와 비교하였다. NaB, FOS, B-FOS, 포도당은 멸균된 3차 증류수로 10%(w/v) 용액을 만든 후, 0.2 μm 멤브레인 필터(Pall Corporation, Michigan, USA)로 여과 후 사용하였다. 멸균된 당이 없는 BHIB에 각 물질의 농도가 1%, 0.5%(w/v)가 되도록 제조한 뒤 96-well 플레이트에 198 μl 씩 분주하였다 [13].

2.4.2 미생물의 생장곡선 측정

활성화된 균의 배양 배지에 있는 포도당 혹은 다른 탄소원을 제거하기 위해, 배양균을 원심분리($15,000 \times g$, 5 분)하고 상등액을 버린 후 가라 앉은 균체를 PBS(pH 7.4)로 2 번 세척 하였다 [35]. PBS에 풀어진 균 현탁액을 96-well 플레이트의 각 배지에 $2 \mu\text{L}$ 씩 접종한 후 Whitley jar gassing system(Don Whitley Scientific, Shipley, UK)을 사용하여 혐기 상태로 37°C 에서 24 시간 동안 배양하였다. 균의 증식은 배양액의 광학 밀도(optical density, OD) 값으로 확인하였으며 microplate reader(BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정한 후 생장 곡선을 그렸다. 균의 생장은 물질의 농도가 1%(w/v)일 때 최대 OD₆₀₀ 값을 비교하여 분석하였다 [37]. 균을 접종하지 않은 배지를 blank 로 설정하였고 3 번 실험을 반복하여 평균으로 나타내었다 [13]. 배양된 균의 배양 상등액은 이후 실험에 사용하기 위해 수집 하였다.

2.5 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)와 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 통한 장내 균의 B-FOS 이용 확인

2.5.1 균 배양액의 TLC 및 HPLC

B. longum BORI, *E. faecalis*의 배양액을 TLC로 분석하여 균에 의해 소비된 탄소원을 비교하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다. 또한, 대사산물의 분석을 위하여 *B. longum* BORI, *E. faecalis*, *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum*, *E. coli*, *B. longum* RD47의 배양 상등액을 HPLC로 분석하였다. 젖산(lactic acid)과 초산(acetic acid), 부티르산(butyric acid)의 생성 여부를 확인하였으며 외부 표준물질들을 시료와 같은 조건에서 분석하여 각각 4 가지 농도에서 검량곡선을 작성하였다. 대조균은 균을 넣지 않은 배지로 설정하였다. YL9100 HPLC system(Younglin, Anyang, South Korea)이 사용되었고 Aminex HPX-87H column, $300 \times 7.8 \text{ mm}$ column(Bio-rad, California, USA)을 사용

하였다. 이동상으로는 5 mM 황산이 사용되었고 유속은 0.6 mL/min, 컬럼 온도는 50℃로 유지하였다. 모든 배양액은 PVDF Acrodisc syringe filter(0.2 μ m, 13 mm, Pall Corporation, Michigan, USA)로 여과하고 20 μ l 주입하였다. 이후 실험의 모든 HPLC는 이와 같은 조건으로 행해졌다.

Table 2. Conditions of HPLC for analysis of lactic acid, acetic acid, and butyric acid

Instrument	YL9100 HPLC system
Column	Aminex HPX-87H column 300 × 7.8 mm
Mobile phase	5 mM H ₂ SO ₄
Flow rate	0.6 mL/min
Temperature	50°C
Detection	Refractive Index(RI)
Injection volume	20 μ l

2.5.2 B-FOS와 균 배양액, 균체, 균체 파쇄액의 반응

균에 의한 B-FOS의 분해 여부를 확인하기 위해 사용된 균주는 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *E. faecalis*이다. 균 현탁액은 원심 분리하여 균체와 배양액을 분리하였다. 균체는 PBS로 2회 세척한 후 PBS에 현탁한 현탁물을 사용하였다. 균체 파쇄액은 PBS에 현탁한 현탁물을 초음파 파쇄기(Qsonica, Newtown, CT, U.S.A)로 5 분 간격으로(amp 38%) 10 분 동안 파쇄한 후 원심분리($15,000 \times g$, 10 분)하고 상등액을 균체 파쇄액으로 사용하였다. 대조군은 균이 들어가지 않은 그룹으로 설정하였다. 균 배양액, 균체 현탁액, 균체 파쇄액($180 \mu\text{l}$)을 각각 10%(w/v)의 B-FOS, FOS 용액($20 \mu\text{l}$)과 1 시간 동안 37°C 에서 반응 시킨 후 끓는 물에 10 분 가열하여 반응을 중지시켰다. TLC를 통해 반응 전 후 결과를 비교했으며 부티르산의 분해 여부는 HPLC를 이용하여 분석하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.6 B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향

높은 농도(4.5 g/L)의 포도당을 함유한 Caco-2 세포의 표준 배양 배지에서 세포 생장의 에너지원으로써 포도당이 주로 사용되는 현상을 배제하기 위해 포도당이 없는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는 조건일 때와 세포의 생장을 비교하였다 [38].

2.6.1 실험 배지 제조

NaB, FOS, B-FOS는 PBS로 10%(w/v)용액을 만든 후, $0.2 \mu\text{m}$ 멤브레인 필터로 여과하였다. 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 함유된(Glu+Pyr+) DMEM 배지와 함유되지 않은(Glu-Pyr-) DMEM 배지에 NaB, FOS, B-FOS가 각각 0.005-0.06%(w/v)가 되도록 제조한 후 실험

에 사용하였다.

2.6.2 Trypan blue 색소 배제법(dye exclusion assay)을 통한 Caco-2 세포의 수 측정

25 cm² 플라스크(SPL Life Science, Pocheon, South Korea)에 5×10^5 세포로 1.5 mL씩 접종하고 50%의 융합성(confluent)을 보일 때까지 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 3 일 동안 배양하였다. 이후 0.005–0.06% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 첨가된 배지로 교체 후 같은 조건에서 4 일 동안 배양하였다. 배양 상등액은 실험에 사용하기 위해 수집했고 부착 세포는 PBS로 2 회 세척하고 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크에서 분리하였다. 분리된 세포는 0.4% trypan blue 용액으로 염색하여 hemacytometer(Marienfeld-Superior, Berlin, Germany)로 살아있는 세포의 수를 측정하였다 [39]. 대조군은 PBS를 첨가한 배지로 설정하였고 3 번 실험을 반복하여 평균으로 나타내었다.

2.7 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해 여부

2.7.1 Caco2 세포 배양액의 TLC 및 HPLC

수집한 Caco-2 세포 배양액을 TLC로 분석하여 소비된 탄소원을 확인했고 HPLC를 통해 부티르산의 존재 여부를 조사하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.7.2 B-FOS와 세포 배양액, 세포, 세포 파쇄액의 반응

Caco-2 세포에 의한 B-FOS의 분해 여부를 확인하기 위하여 일반 배지에서 배양된 Caco-2 세포의 배양 상등액을 세포 배양액으로 사용했다. 세포 현탁액은 trypsin/EDTA를 처리하여 분리된 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 현탁한 현탁물을 사용했고 현탁물을 초음파 파쇄기를 이용하여 4 분 간격으로(amp 25%) 8 분 동안 파쇄해 원심분리 후 얻은 상등액

을 세포 파쇄액으로 사용하였다. 세포 배양액, 현탁액, 파쇄액(450 μ l)은 10% (w/v) FOS, B-FOS(50 μ l)와 3 시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 분해 여부는 TLC를 통해 반응 전과 후를 비교했으며 HPLC를 이용하여 B-FOS로부터 부티르산의 분해 여부를 분석하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였으며 HPLC 조건은 Table 2와 동일하였다.

2.8 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석에 의한 세포 생존율 측정

B-FOS로 유도되는 세포독성을 확인하기 위해 MTT 분석을 실시하였다. Caco-2 세포를 96-well 플레이트에 well 당 2,000 세포의 농도로 100 μ l씩 분주하여 48 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 이 후 기존 배지를 제거하고 0.02-0.1% (w/v) 농도의 NaB, FOS, B-FOS가 첨가된 배지(180 μ l)로 교체하고 24 시간, 48 시간, 72 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 5 mg/mL MTT 용액(20 μ l)을 각 well에 가하여 다시 4 시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 형성된 결정은 dimethyl sulfoxide(DMSO) (100 μ l)를 가하여 용해시키고 570 nm에서 microplate spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 물질을 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 산출하였고 4 번 실험을 반복하여 평균을 나타내었다 [40].

2.9 전기 저항값(Trans-Epithelial Electrical Resistance, TEER) 측정

치밀이음부(tight junction)는 세포 장벽을 형성하는 세포 간 접합으로 치밀이음부(tight junction)의 이온 투과성은 일반적으로 세포 단층의 TEER을 측정하여 확인한다 [41]. Caco-2 세포를 12-well transwell system 플레이트에 1.5×10^6 세포의 농도로 상층부(apical chamber)에 0.5 mL씩 분주하고 하층부(basal chamber)에 배지 1.5 mL를 분주하였다. 37°C에서 5% CO₂ 세포배양기에서 3 일 동안 배양한 후 0.02, 0.08% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 포함된 배지로 바꿔주었고

대조군으로 PBS를 넣은 배지를 사용했다. TEER은 epithelial voltohmmeter(Millicell ERS system, Millipore, Bedford, MA, USA)을 사용하여 4 일 동안 24 시간 간격으로 측정하였다. 세포가 없는 well의 TEER 값을 blank로 사용하였으며 측정된 값과 플레이트의 면적을 이용하여 결과 값을 계산하였다. 실험은 3 번 반복하여 평균으로 나타내었다 [40].

2.10 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 처리한 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량 측정

LPS 자극에 의한 IL-8의 생성량에 B-FOS가 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-29 세포를 사용하였다 [42]. 96-well 플레이트에 HT-29 세포를 1×10^4 세포로 150 μ l씩 well에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24 시간 동안 배양 한 후 LPS(100 ng)와 0.1%(w/v)의 NaB, FOS, B-FOS가 포함된 배지로 교환하여 같은 조건에서 배양하였다 [43]. 처리 물질의 농도는 선행연구를 토대로 HT-29 세포에서 48시간 까지 NaB에 의해 독성을 나타내지 않는 최대농도인 0.1%(w/v)로 설정하였다 [44]. 분비된 IL-8의 양은 3 시간, 24 시간, 48 시간 때 각 플레이트의 배양 상등액을 수집하여 Human IL-8 ELISA kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조업체로부터 제공된 프로토콜에 따라 측정하였다. 실험은 3 번 반복하여 평균으로 나타내었다.

2.11 위장 상피세포주인 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부

AGS 세포에 의한 B-FOS 분해 여부를 확인하기 위하여 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는 DMEM배지와 포도당과 피루브산이 없는 DMEM 배지에 0.06%(w/v)의 FOS와 B-FOS를 첨가하여 AGS 세포를 37°C에서 5% CO₂ 세포배양기에서 4 일 동안 배양 하였다. 이후 TLC를 통해 B-FOS의 분해 여부를 확인하였다. TLC 조건은 B-FOS 정제에서 사용된 조건과 동일하였다.

3. 통계처리

모든 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Ver. 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 통계처리는 일원분산분석(One-Way Analysis of Variance)을 실시하고 유의한 차이가 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후 검증 하였으며 Caco-2 세포 단층의 전기 저항값 (TEER)의 경우 최소 유의차 검정(LSD)에 의해 평균간의 유의차를 검정 하였다. 등분산 가정을 충족하지 않은 경우에는 Welch's test로 분석하고, 유의한 차이가 있는 경우 Games-Howell test로 사후 검증하였다. 유의수준은 P 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

4. 결과

4.1 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)의 정제 결과

컬럼 크로마토그래피를 이용한 정제과정에서 0-70%(v/v) 에탄올 수용액에 용리된 물질의 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 결과는 Fig. 1에 나타냈으며 30-70%(v/v) 에탄올 수용액에서 정제된 B-FOS를 확인하였다.

4.2 산과 열처리에서 B-FOS의 안정성

끓는 물에서 15 분 열 처리된 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)과 B-FOS, pH 2-4로 조정된 PBS에서 30 분, 1 시간, 3 시간 노출된 B-FOS의 TLC분석 결과는 Fig. 2에 나타냈다. 분석 결과, 열 처리된 FOS와 B-FOS는 TLC 상 변화가 없는 것이 확인되었으며 이 같은 조건에서 안정한 것으로 보인다. 또한, 산성조건(pH 2-4)에서 B-FOS는 3 시간 까지 TLC 상 변화가 없었으며 이 같은 조건에서 안정한 것으로 사료된다.

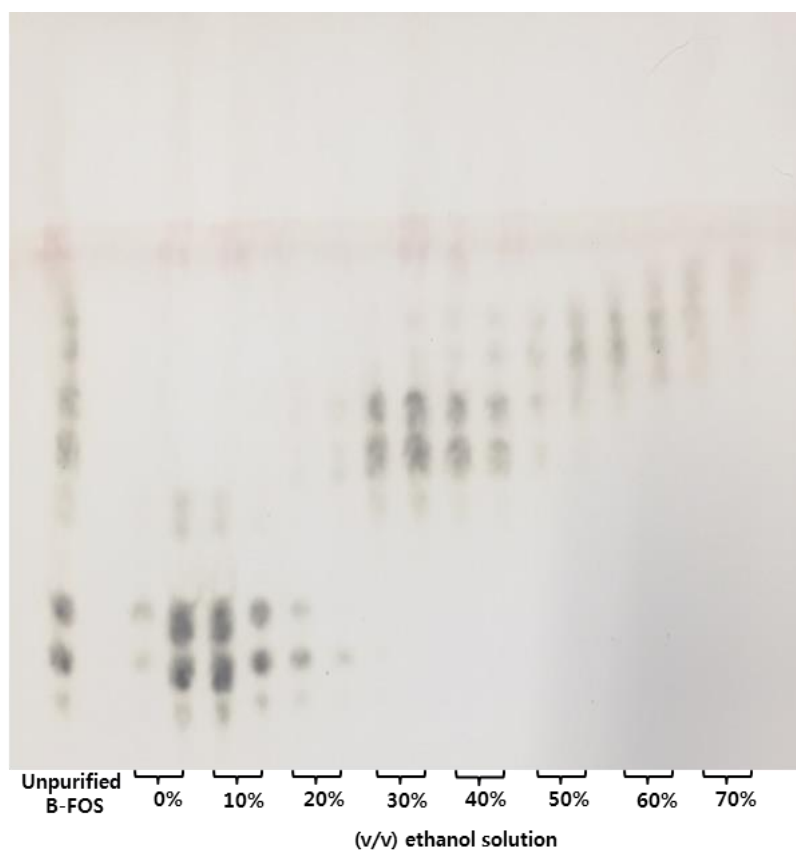


Fig. 1. Determination of butyryl-fructooligosaccharides during purification by TLC

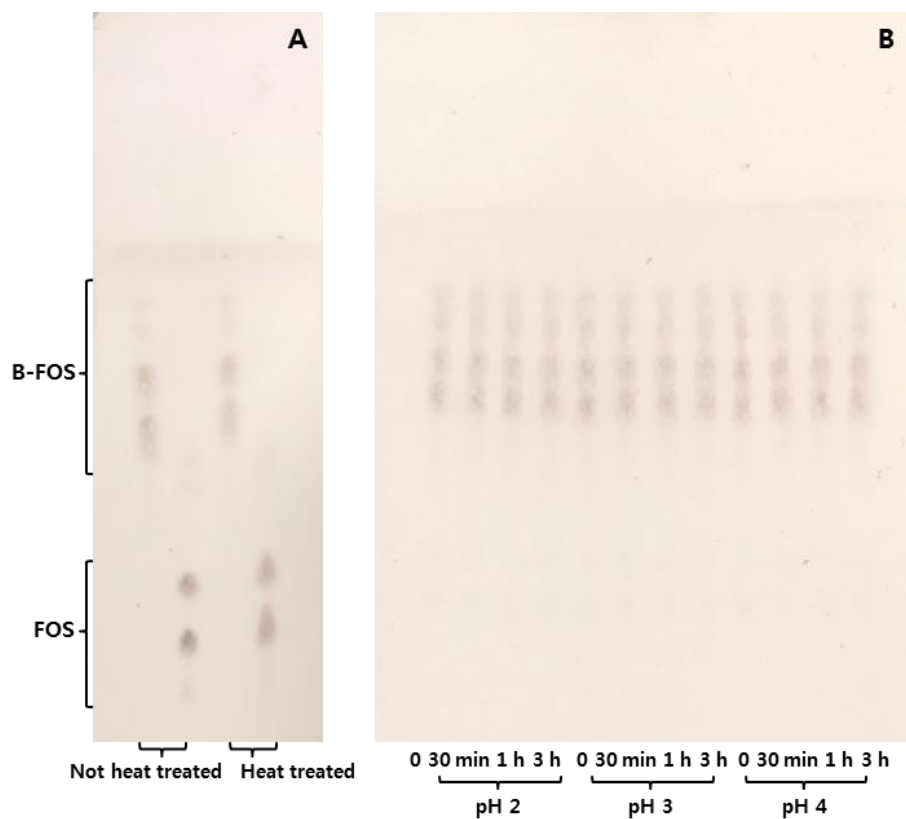


Fig. 2. Assessment of stability of B-FOS by TLC. FOS and B-FOS treated for 10 min in boiling water(A) and B-FOS treated for 30 min, 1 h, and 3 h under pH 2–4 (B).

4.3 나트륨 부티레이트(sodium butyrate, NaB), FOS, B-FOS, 포도당이 장내 세균의 생장에 미치는 영향

0.5, 1% (w/v)의 NaB, FOS, B-FOS, 포도당이 첨가된 배지에서 균의 생장 곡선을 측정한 결과는 Fig. 3 - Fig. 5와 같으며 물질의 농도가 1% (w/v)일 때 14 개 균주의 최대 OD₆₀₀ 값을 Table 3에 나타내었다. 양성대조군으로서 포함된 포도당은 실험에 사용된 모든 균에 의해 잘 이용되었다. 탄소원이 없는 기본 배지는 음성대조군으로 포함되었으며 음성대조군과 NaB가 포함된 배지에 배양된 균은 양성대조군보다 낮은 수준으로 대부분 잘 성장하지 못하였다. 특히, 음성대조군에서 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)에 속하는 *Staphylococcus aureus* (OD₆₀₀ = 0.36)와 *Clostridium butyricum* (OD₆₀₀ = 0.49)은 1% (w/v)의 NaB가 존재할 때, 최대 OD₆₀₀ 값이 각각 0.25, 0.42로 균의 생장이 유의적으로 저해된 결과를 나타내었다. 비피도박테리아의 생장곡선은 Fig. 3과 같으며 음성대조군과 비교했을 때 *Bifidobacterium longum* RD72와 *B. animalis*를 제외한 모든 비피도박테리아 균주는 FOS가 첨가되었을 때 유의적으로 최대 OD₆₀₀ 값이 높았으며 생장이 촉진되는 결과를 보였다. 한편, B-FOS는 *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B. catenulatum*과 *B. animalis*의 생장을 유의적으로 촉진했으며 특히 *B. bifidum* BGN4와 *B. longum* BORI는 대조군보다 최대 OD₆₀₀ 값이 약 2 배 높았다. 또한, *B. bifidum* BGN4와 *B. animalis*는 FOS가 존재할 때와 유의적으로 차이가 없었으며 FOS와 같은 수준으로 B-FOS가 균의 생장을 촉진한 결과를 나타냈다. 젖산균의 생장 곡선은 Fig. 4에 나타내었다. FOS는 음성대조군에 비해 모든 젖산균의 생장을 유의적으로 촉진했으며 B-FOS는 *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*와 *Streptococcus thermophilus*의 생장을 각각 약 3 배, 1.2 배, 5 배 유의적으로 증가시켰다. Non-probiotic 균주의 생장곡선은 Fig. 5와 같다. FOS는 *S. aureus*, *Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*를 제외한 대다수의 non-probiotic 균주의 생장을 유의적으로 촉진

진하였다. 반면, B-FOS는 대다수 균주의 생장을 촉진하지 않았으며 음성 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 *Listeria monocytogenes*, *Prevotella intermedia*, *C. perfringens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*의 생장은 각각 약 1.4 배, 1.5 배, 2 배, 3 배 증가하였다.

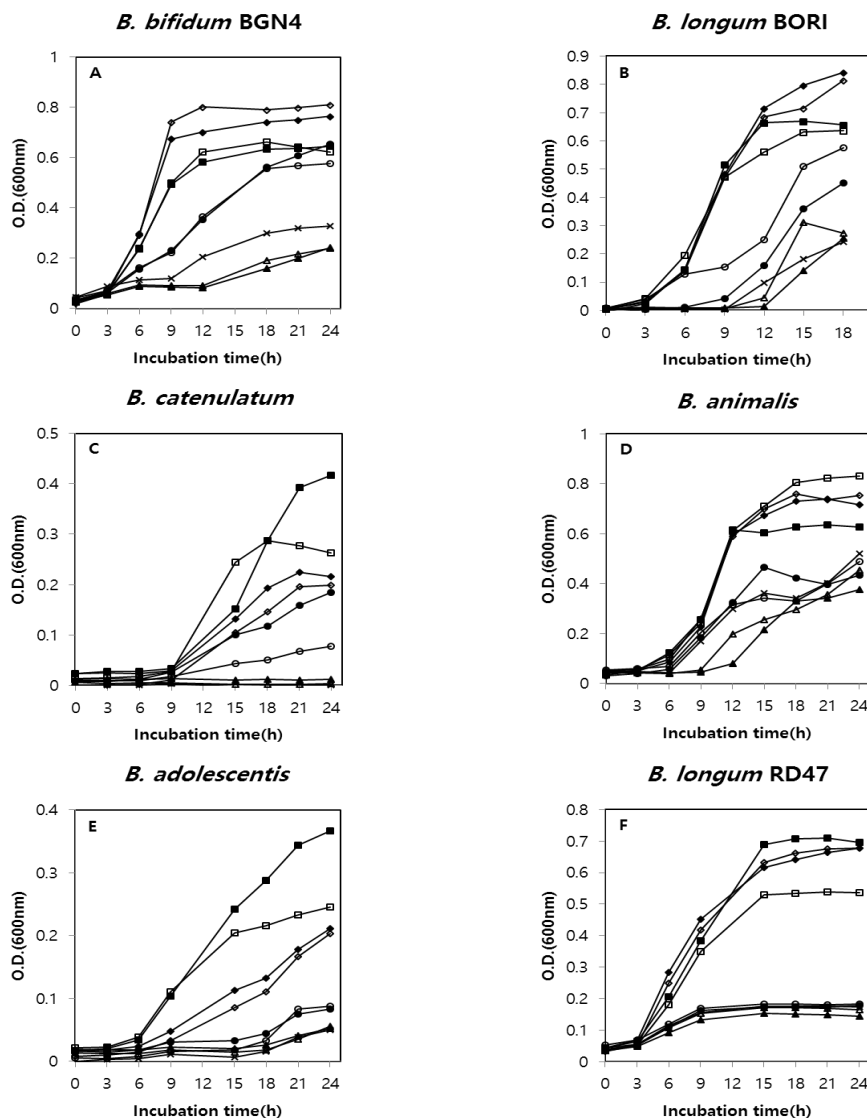


Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(△), FOS(□), B-FOS(○), glucose(◇) and 1% (w/v) NaB(▲), FOS(■), B-FOS(●), glucose(◆), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

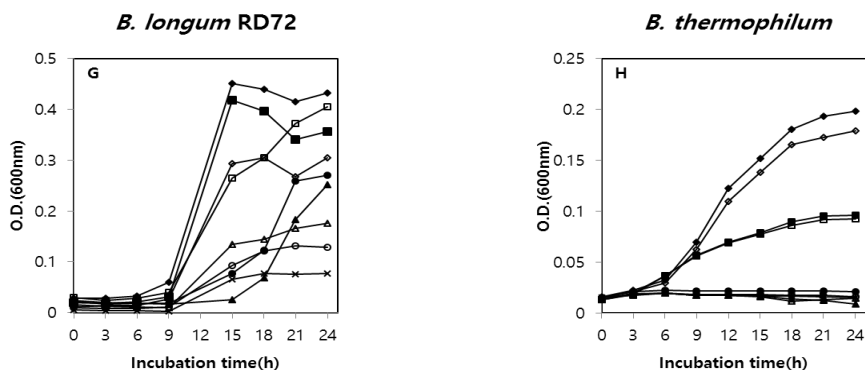


Fig. 3. Growth curve of bifidobacterial strains in media containing different ingredients(continued). Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(△), FOS(□), B-FOS(○), glucose(◇) and 1% (w/v) NaB(▲), FOS(■), B-FOS(●), glucose(◆), and sterile DI water(X) at 37 °C under anaerobic conditions.

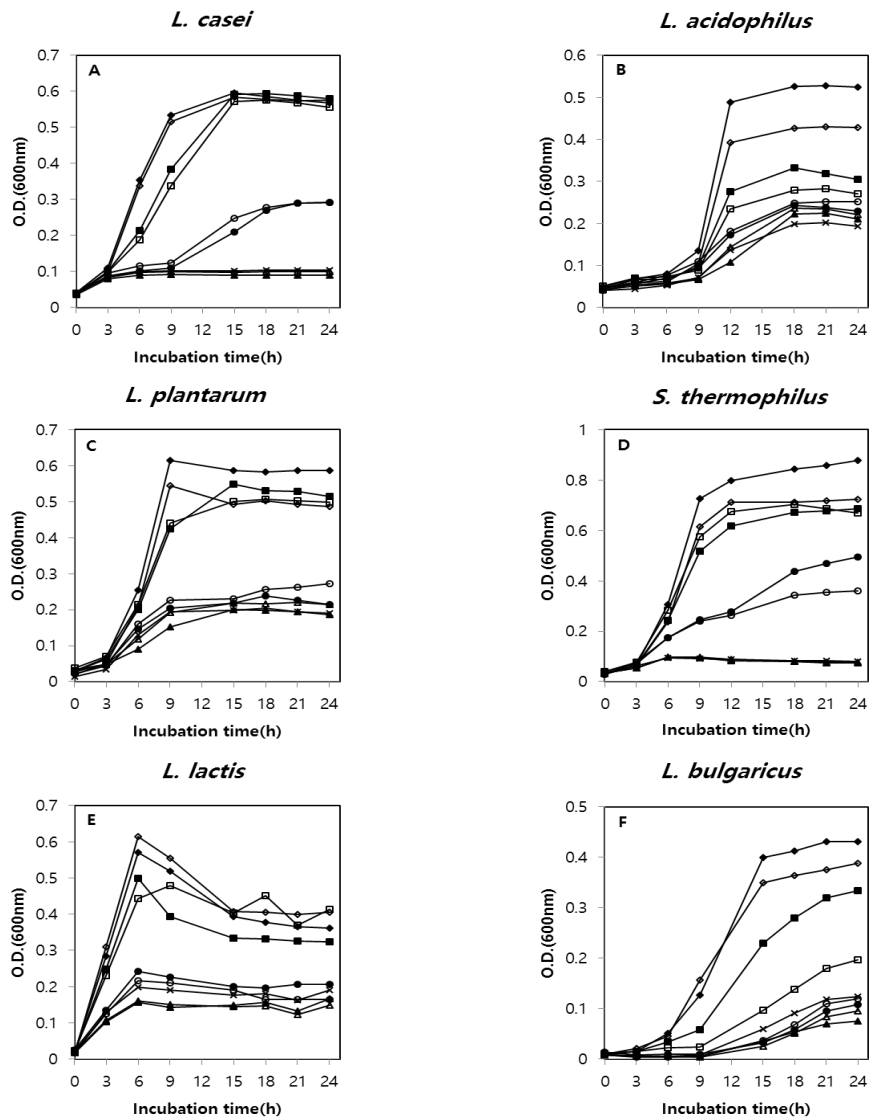


Fig. 4. Growth curve of lactic acid bacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB(\triangle), FOS(\square), B-FOS(\circ), glucose(\diamond) and 1% (w/v) NaB(\blacktriangle), FOS(\blacksquare), B-FOS(\bullet), glucose(\blacklozenge), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

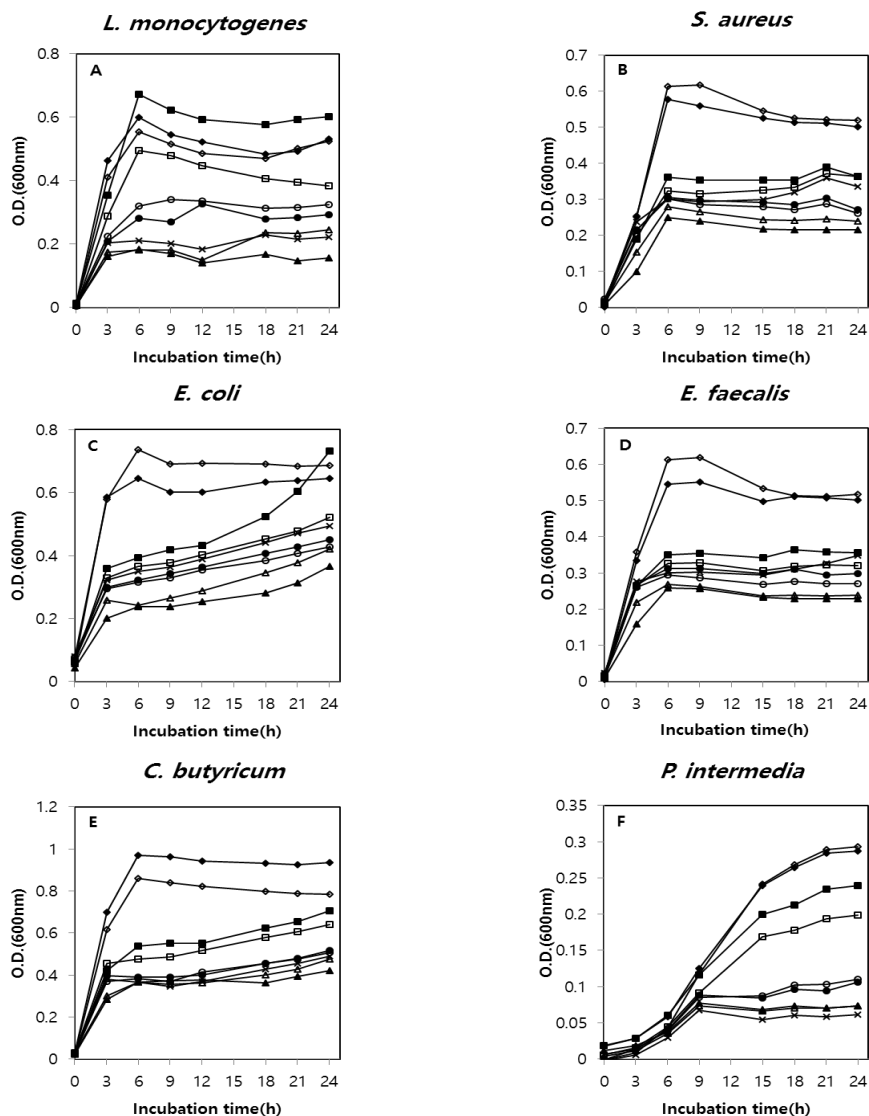


Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients. Each medium containing 0.5% (w/v) NaB (△), FOS (□), B-FOS (○), glucose (◇) and 1% (w/v) NaB (▲), FOS (■), B-FOS (●), glucose (◆), and sterile DI water (X) at 37 °C under anaerobic conditions.

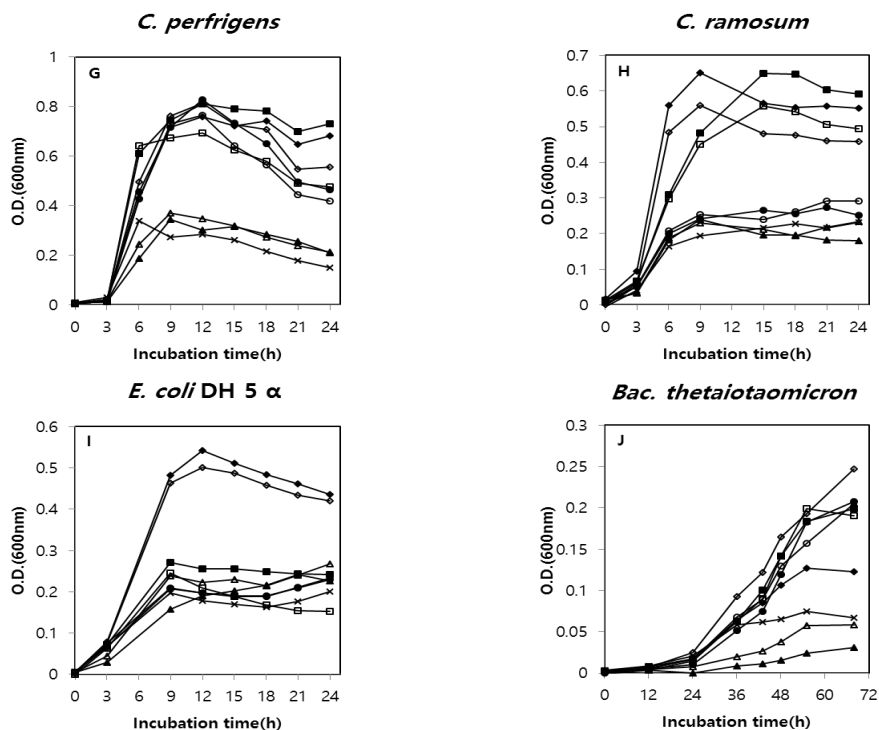


Fig. 5. Growth curve of non-probiotic bacterial strains in media containing different ingredients(continued). Each medium containing 0.5%(w/v) NaB(\triangle), FOS(\square), B-FOS(\circ), glucose(\diamond) and 1%(w/v) NaB(\blacktriangle), FOS(\blacksquare), B-FOS(\bullet), glucose(\blacklozenge), and sterile DI water(X) at 37°C under anaerobic conditions.

Table 3. Maximum growth(OD₆₀₀ nm) of bacteria cultured in media containing different ingredients at 37°C under anaerobic conditions

Strains	Control		NaB		FOS		B-FOS		Glucose	
	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)	Maximum growth(OD ₆₀₀ nm)	TRMG (h)
<i>B. longum</i> BORI	0.24±0.05 ^a	18	0.25±0.04 ^a	18	0.67±0.01 ^c	18	0.45±0.05 ^b	18	0.84±0.04 ^d	18
<i>B. adolescentis</i>	0.05±0.01 ^a	24	0.05±0.03 ^a	24	0.37±0.03 ^c	24	0.08±0.02 ^a	24	0.21±0.06 ^b	24
<i>B. longum</i> RD47	0.18±0.01 ^a	18	0.15±0.01 ^a	15	0.71±0.02 ^b	21	0.18±0.01 ^a	24	0.68±0.05 ^b	24
<i>L. casei</i>	0.1±0.01 ^a	24	0.09±0.00 ^a	9	0.59±0.02 ^c	18	0.29±0.03 ^b	24	0.6±0.01 ^c	15
<i>L. acidophilus</i>	0.2±0.02 ^a	21	0.22±0.01 ^a	21	0.33±0.03 ^b	18	0.24±0.01 ^a	18	0.53±0.02 ^c	21
<i>L. plantarum</i>	0.2±0.01 ^a	18	0.2±0.02 ^a	15	0.55±0.04 ^b	15	0.24±0.00 ^a	18	0.61±0.04 ^c	9
<i>L. bulgaricus</i>	0.12±0.05 ^a	24	0.08±0.07 ^a	24	0.33±0.13 ^b	24	0.11±0.06 ^a	24	0.43±0.06 ^b	24
<i>L. lactis</i>	0.2±0.00 ^a	6	0.17±0.02 ^a	24	0.5±0.03 ^c	6	0.24±0.01 ^b	6	0.57±0.02 ^d	6
<i>L. monocytogenes</i>	0.23±0.06 ^a	18	0.18±0.01 ^a	6	0.67±0.06 ^c	6	0.33±0.13 ^b	12	0.6±0.02 ^c	6
<i>S. aureus</i>	0.36±0.04 ^{bc}	21	0.25±0.02 ^a	6	0.39±0.05 ^c	21	0.31±0.01 ^{ab}	6	0.58±0.03 ^d	6
<i>C. butyricum</i>	0.49±0.01 ^b	24	0.42±0.02 ^a	24	0.71±0.03 ^c	24	0.52±0.01 ^b	24	0.97±0.04 ^d	6
<i>P. intermedia</i>	0.07±0.00 ^a	9	0.08±0.00 ^a	9	0.24±0.01 ^c	24	0.11±0.01 ^b	24	0.29±0.01 ^d	24
<i>C. ramosum</i>	0.23±0.01 ^a	24	0.24±0.01 ^a	9	0.65±0.06 ^b	15	0.27±0.04 ^a	21	0.65±0.02 ^b	9
<i>C. perfringens</i>	0.34±0.04 ^a	6	0.34±0.01 ^a	9	0.81±0.02 ^{bc}	12	0.83±0.0 ^c	12	0.76±0.04 ^b	12

TRMG represents the time needed in hours to reach the maximum optical density (OD₆₀₀). The concentrations of PBS, NaB, FOS, B-FOS, and glucose are 1% (w/v).

Data are expressed as means ± SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences of the effect of the ingredients followed by Duncan' s test after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.4 장내 균의 B-FOS 이용 및 분해

4.4.1 배지의 탄소원 종류에 따른 균 배양 상등액 분석

탄소원으로써 FOS, B-FOS, 포도당을 각각 포함한 배지에서 배양된 *B. longum* BORI와 *E. faecalis*의 배양 상등액 TLC 결과는 Fig. 6에 나타냈으며 균을 접종하여 배양했을 때 균을 접종하지 않았을 때 비해 배양 상등액에서 탄소원인 FOS, B-FOS, 포도당의 밴드가 없어지거나 밴드의 세기가 약해지는 결과를 보였다. B-FOS의 경우 *E. faecalis*보다 *B. longum* BORI를 배양했을 때 밴드의 세기가 더 약해지는 결과를 나타냈다. *B. longum* BORI를 포함하여 B-FOS 배지에서 생장이 촉진됐던 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum* 균 4 개와 생장이 촉진되지 않았던 *E. coli*, *B. longum* RD47, *E. faecalis* 균 3 개의 배양 상등액에 있는 젖산, 초산, 부티르산을 고성능 액체 크로마토 그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 확인한 결과는 Table 4에 나타냈다. NaB 배지에서 배양된 모든 균주의 배양액에서는 부티르산이 검출되었다. 반면, FOS와 포도당이 첨가된 배지에서는 모든 균주에서 많은 양의 초산과 젖산이 검출되었고 초산에 비해 젖산의 양이 더 많았다. B-FOS 배지의 경우 FOS와 포도당이 첨가된 배지에서 검출되지 않은 부티르산이 *E. coli*와 *B. longum* RD47을 제외한 모든 균주의 배양 상등액에서 검출되었다. 특히, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 *B. bifidum* BGN4, *L. casei*, *B. catenulatum*, *Bac thetaiotaomicron*의 배양 상등액에서 많은 양의 젖산과 초산이 검출된 결과를 확인할 수 있었다.

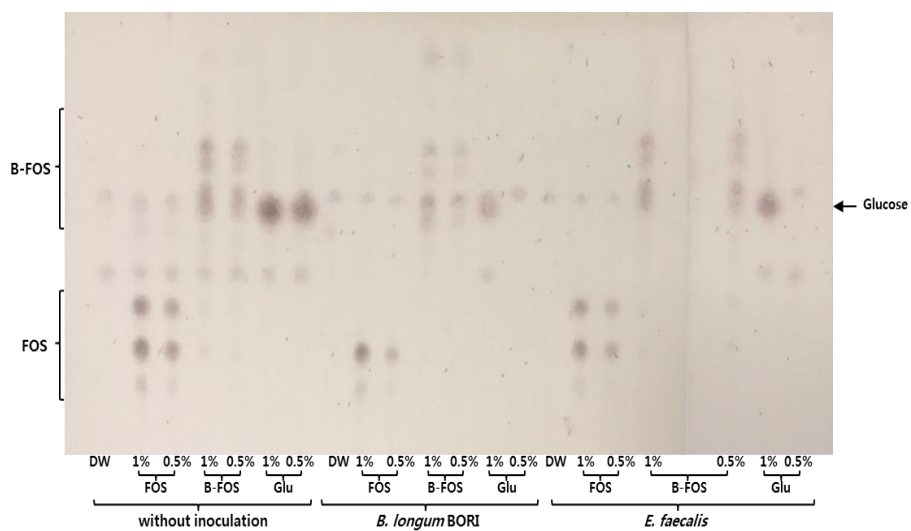


Fig. 6. TLC analysis of culture supernatants of *B. longum* BORI and *E. faecalis* cultured in medium with different carbon source

Table 4. Detection of organic acids in culture supernatants of bacteria cultured in media containing different ingredients

	Control			NaB			FOS			B-FOS			Glucose		
	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid
PBS	+	+	-	+	+	+++	++	++	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. bifidum</i> BGN4	++	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+++	+	+	+++	+	-
<i>B. longum</i> BORI	+	+	-	+	+	+++	++	++	-	+	++	+	+++	++	-
<i>B. catenulatum</i>	+	+	-	++	+	+++	++	++	-	++	++	+	++	++	-
<i>B. longum</i> RD47	+	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+	+	-	+++	+	-
<i>L. casei</i>	++	+	-	+	+	+++	+++	++	-	+++	++	+	+++	+	-
<i>Bac. thetaiotaomicron</i>	-	++	-	-	+	+++	++	+	-	++	+	+	++	++	-
<i>E. coli</i>	-	++	-	-	+	+++	++	++	-	+	+	-	+++	++	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+	+	+	+++	+	-
<i>Bac. fragilis</i>	+	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+	+	+	+++	+	-

The number of ‘+’ represents the concentration of organic acid.

‘-’ ; not detected, ‘+’ ; 0.05% (v/v) or less, ‘++’ ; 0.05% (v/v) – 0.25% (v/v), ‘+++’ ; more than 0.25% (v/v)

4.4.2 B-FOS와 균 배양 상등액, 균체, 균체 파쇄액의 반응 결과

B. bifidum BGN4, *L. casei*, *E. faecalis*의 균체, 균 파쇄액, 균 배양액을 FOS, B-FOS와 각각 반응 시켜 봄으로써 균에 의한 B-FOS의 분해 여부를 TLC로 확인한 결과는 Fig. 7에 나타났다. FOS는 모든 반응에서 반응 전 후 TLC 상 변화가 없었다(Fig. 7A, B). 한편, 균체와 균 파쇄액을 B-FOS와 반응 시켰을 때 반응 전에 비해(Fig. 7A) 3 개의 균주에서 모두 FOS의 밴드가 생성되는 것이 확인되었고 균 배양 상등액과 반응했을 때는 확인되지 않았다(Fig. 7B). HPLC를 통해 부티르산의 검출 여부를 분석한 결과는 Table 5에 나타내었다. 3 개의 균주 모두 균체와 균 파쇄액이 B-FOS와 반응했을 때 부티르산이 검출됐지만, 균 배양 상등액과 반응했을 때는 검출되지 않았다. 또한, 분석된 균에 의하면 이러한 반응은 분석된 모든 균에서 발생함을 확인할 수 있었다.

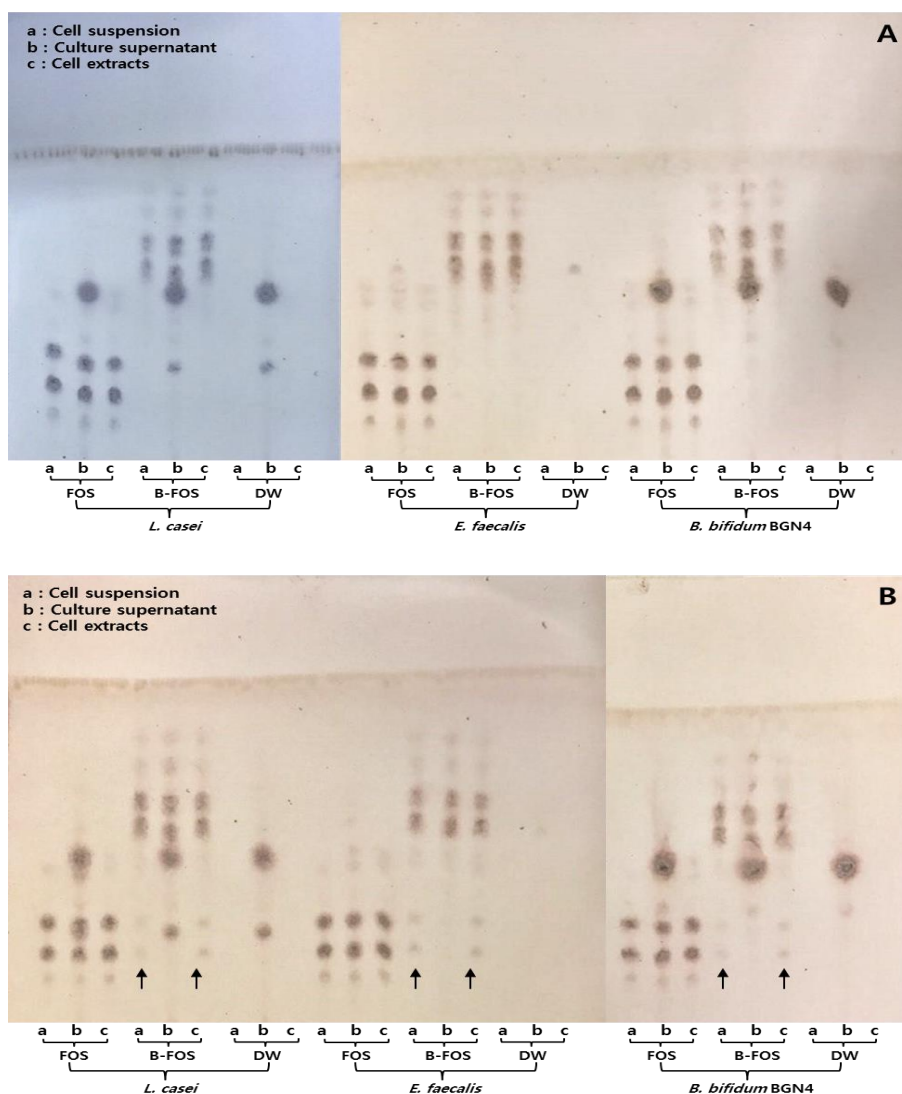


Fig. 7. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by bacteria. Before the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants, and cell extracts(A) and after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants, and cell extracts (B).

Table 5. Detection of butyric acid by HPLC after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatant, and cell extracts

	<i>B. bifidum</i> BGN4		<i>L. casei</i>		<i>E. faecalis</i>	
	B-FOS	DI water	B-FOS	DI water	B-FOS	DI water
Cell suspension	+	-	+	-	+	-
Culture supernatant	-	-	-	-	-	-
Cell extract	+	-	+	-	+	-

‘+’ ; Butyric acid was detected, ‘-’ ; Butyric acid was not detected

4.5. 배지 구성에 따른 Caco-2 세포 생장의 변화

포도당과 피루브산의 유무에 따라 NaB, FOS, B-FOS를 0-0.06% (w/v)의 농도로 첨가하여 4 일 동안 배양 한 후 각 물질의 농도에 따른 세포 수를 센 결과는 Fig. 8에 나타냈다. 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재하는(Glu+Pyr+) 배지에 NaB를 첨가했을 때 0.005%, 0.04%, 0.06% (w/v)의 농도에서 대조군에 비해 각각 약 30%, 50%, 65%의 세포 수가 유의적으로 감소하였다(Fig. 8A). 한편, 포도당과 피루브산이 존재하지 않는(Glu-Pyr-) 경우는 0.005%, 0.02% (w/v)에서 세포 수가 증가하는 양상을 보였지만 0.04% (w/v)까지 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 하지만 0.06% (w/v)의 농도에서 대조군보다 35% 감소하여 유의적으로 낮은 결과를 보였다(Fig. 8B). FOS를 첨가한 배지에서는 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지의 경우 모두 대조군과 유의적인 차이가 없었다(Fig. 8C, D). B-FOS를 첨가했을 때 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지는 모두 0.02% (w/v)까지 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 0.06% (w/v)의 농도에서 각각 약 1.5 배, 1.7 배 세포 수가 유의적으로 증가한 결과를 보였다(Fig. 8E, F).

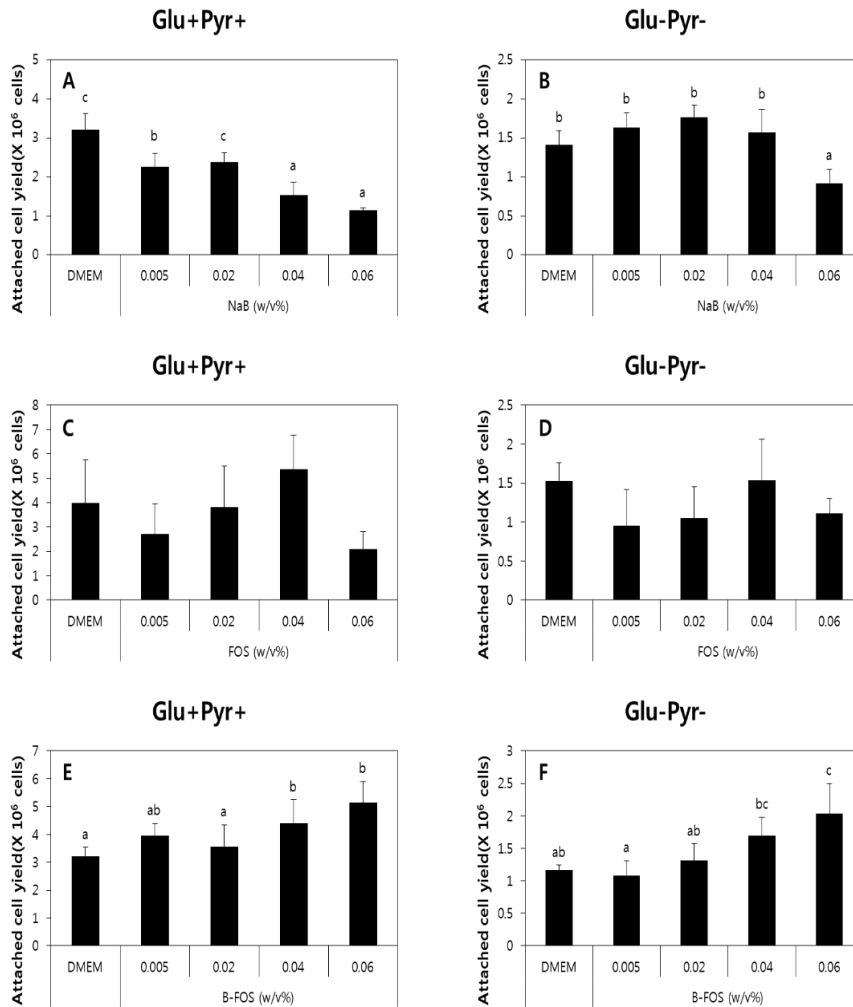


Fig. 8. Change in the number of Caco-2 cells depending on the presence of glucose and pyruvate. The number of Caco-2 cells treated with NaB(A, B), FOS(C, D), and B-FOS(E, F).

‘Glu+Pyr+’ and ‘Glu-Pyr-’ represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

Data are expressed as means \pm SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences of the effect of the concentration followed by Duncan’s test after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.6 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 및 분해

4.6.1 Caco-2 세포 배양 상등액의 TLC 및 HPLC

FOS와 B-FOS가 포함된 배지에서 Caco-2 세포를 배양한 후 배양 상등액을 TLC로 분석한 결과는 Fig. 10과 같다. Glu+Pyr+배지에 존재하는 포도당 밴드는 배양한 후 모든 배지에서 완전히 사라졌으나 FOS는 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지에서 모두 TLC 상 변화가 없었다. B-FOS가 포함된 Glu+Pyr+배지와 Glu-Pyr-배지의 배양 상등액에서는 FOS 밴드가 생성됨을 확인하였고 Glu+Pyr+배지 보다 Glu-Pyr-배지일 때 더 뚜렷한 밴드를 나타냈다. B-FOS 밴드의 경우 Glu-Pyr-배지에서 다소 사라지는 결과를 볼 수 있었다. 따라서 B-FOS는 Caco-2 세포에 의해 이용되었음을 확인할 수 있었고 이용 결과 FOS가 생성됨을 확인할 수 있었다. 배양 후 수집한 세포 배양액과 세포 파쇄액에서 부티르산 존재 여부를 확인한 결과에서는 두 경우 모두 부티르산이 검출되지 않았다(data not shown).

4.6.2 B-FOS와 Caco-2 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액의 반응 결과

Caco-2 세포의 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에 FOS와 B-FOS를 각각 반응 시킨 후 TLC를 통해 확인한 결과는 Fig. 10에 나타냈다. FOS는 모든 반응에서 반응 전 후 TLC 상 변화가 없었다. 한편, B-FOS와 반응시킨 세포 배양 상등액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에서 모두 FOS 밴드의 생성이 확인되었다. HPLC를 통해 B-FOS로부터 부티르산의 분해 여부를 확인하기 위해 분석한 결과 B-FOS와 반응한 세포 배양액, 세포 현탁액, 세포 파쇄액에서 미량의 부티르산이 확인됐다(data not shown).

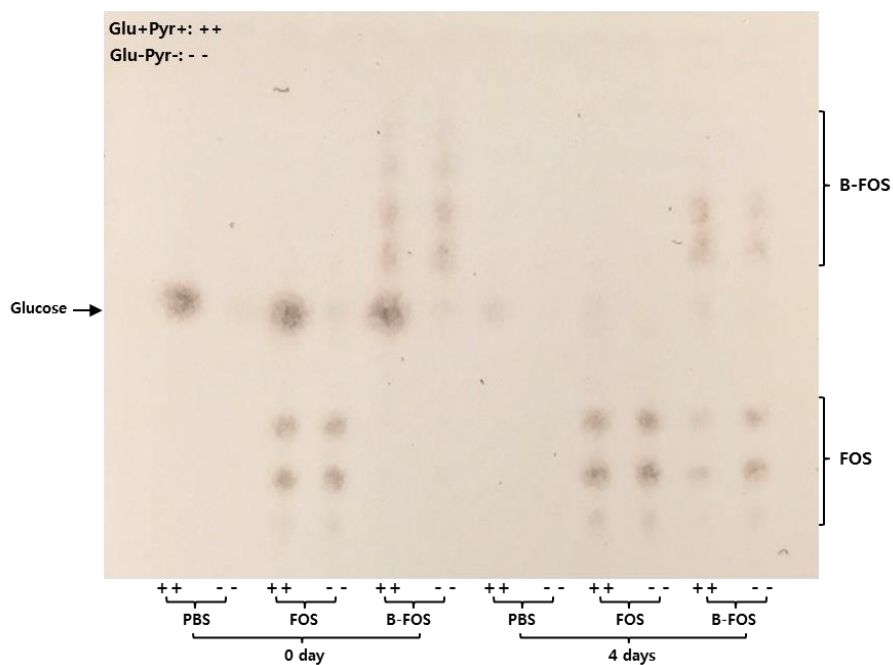


Fig. 9. TLC analysis of the culture supernatants of Caco-2 cells cultured for 4 days in media with FOS and B-FOS

'Glu+Pyr+(++)' and 'Glu-Pyr-(- -)' represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

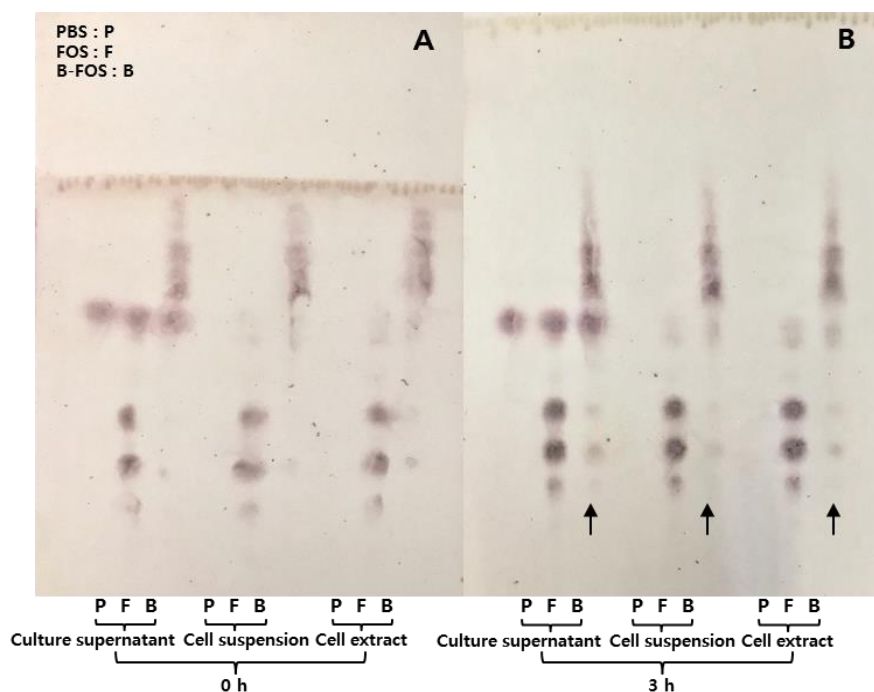


Fig. 10. TLC analyses of B-FOS hydrolyzed by Caco-2 cells. Before the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants and cell extracts(A) and after the reaction of B-FOS with cell suspensions, culture supernatants and cell extracts(B).

4.7 MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석

NaB, FOS, B-FOS가 Caco-2 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT 분석을 실시하여 세포독성을 확인하였다. Fig. 11A에서 보인 바와 같이 NaB는 48 시간 후 0.1% (w/v)의 농도에서 세포 생존율이 $81 \pm 15\%$ 로 유의적으로 감소하였다. 또한, 72 시간 후 0.1% (w/v) 농도에서는 $45 \pm 6.9\%$ 까지 유의적으로 감소하였다. 반면, FOS와 B-FOS는 72 시간 동안 실험된 모든 농도에서 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 0.1% (w/v)의 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 것으로 보인다(Fig. 11B, C).

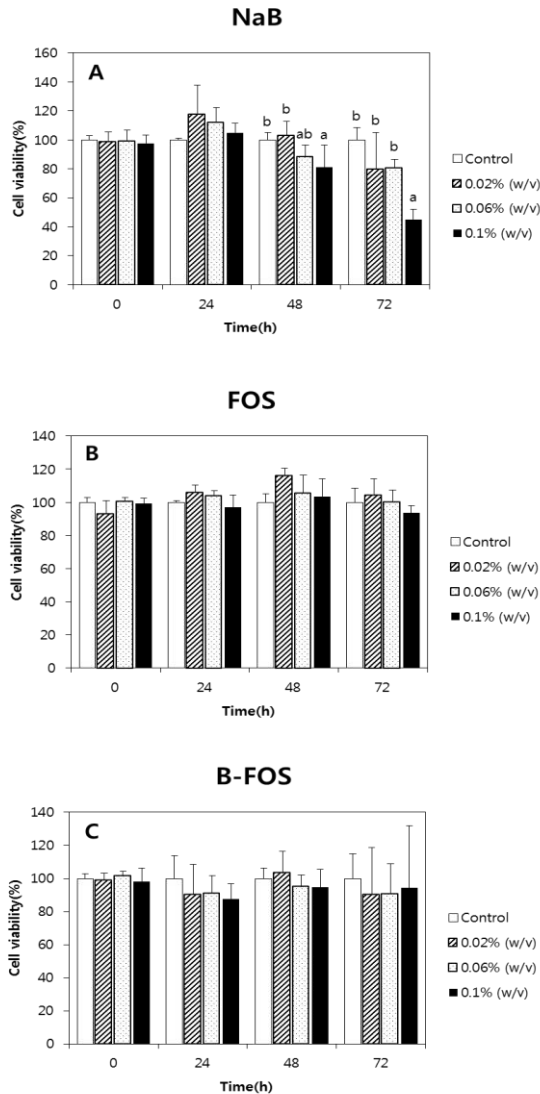


Fig. 11. MTT assays of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS. Cell viabilities of Caco-2 cells treated with NaB(A), FOS(B), and B-FOS(C).

Data are expressed as means \pm SD for n=4. One-way ANOVA followed by Duncan' s test was used to test significance of the effect of the concentration after checking for variance homoscedasticity ($P < 0.05$).

4.8 전기 저항값(Trans-epithelial electrical resistance, TEER) 측정

B-FOS가 치밀이음부(tight junction)의 온전성(integrity)에 미치는 영향을 조사하기 위해 시간에 따른 TEER 값을 측정하였으며 결과는 Fig. 12에 나타냈다. 0.02%(w/v)의 NaB 처리 후 96 시간 까지 TEER 값은 유의적으로 증가하는 결과를 보였으며 NaB 처리 후 96 시간 시점에서 $226 \pm 43.5 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 으로 모든 군에 비해 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 12A). 반면, 0.08%(w/v)의 NaB를 처리했을 경우 72 시간 후부터 모든 군에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였다(Fig. 12B). 한편, FOS와 B-FOS는 두 농도에서 모두 유의적인 차이가 없었다(Fig. 12A, B).

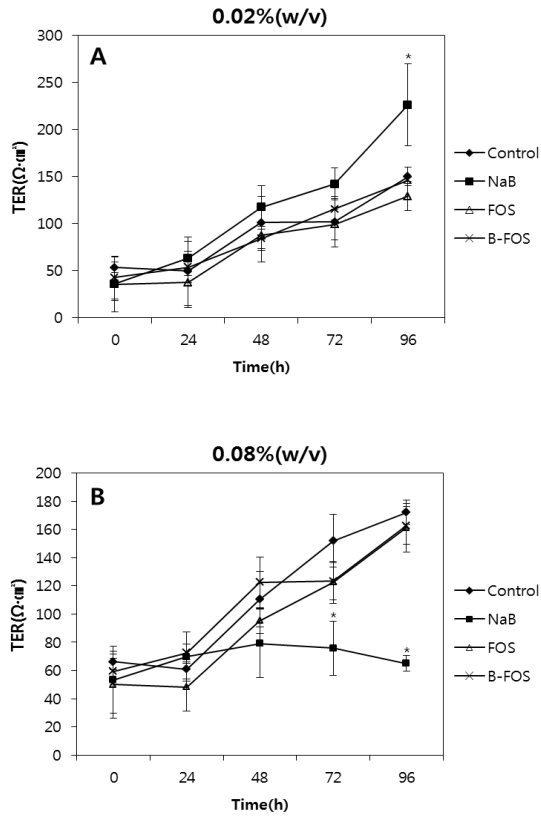


Fig. 12. TEER values of Caco-2 cells cultured in media containing NaB, FOS, and B-FOS. TEER values of Caco-2 cells treated with 0.02% (w/v) (A) and 0.08% (w/v) (B) of substances (NaB, FOS and B-FOS).

Data are expressed as means \pm SD for $n=3$. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and applying the least significant range tests. Asterisk indicates significant difference between control and treatment groups (NaB, FOS, and B-FOS) ($P < 0.01$).

4.9 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극된 HT-29 세포에서 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)의 생성량

LPS로 HT-29 세포의 IL-8 생성을 자극했을 때 B-FOS가 미치는 영향을 확인하고자 ELISA를 실시하였으며 결과는 Fig. 13와 같다. HT-29 세포에 LPS를 처리한 그룹은 3 시간 후부터 처리하지 않은 그룹에 비해 유의적으로 IL-8 생성량이 증가하였다. LPS와 0.1%(w/v)의 NaB를 함께 처리했을 경우 24 시간 후 LPS만 처리한 군에 비해 IL-8 생성량이 약 2.8 배 유의적으로 감소하였으며, 48 시간 후에는 약 3.5 배 유의적으로 감소하였다. 반면, 0.1%(w/v) 농도의 FOS와 B-FOS는 처리 후 96시간 까지 LPS만 처리한 군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

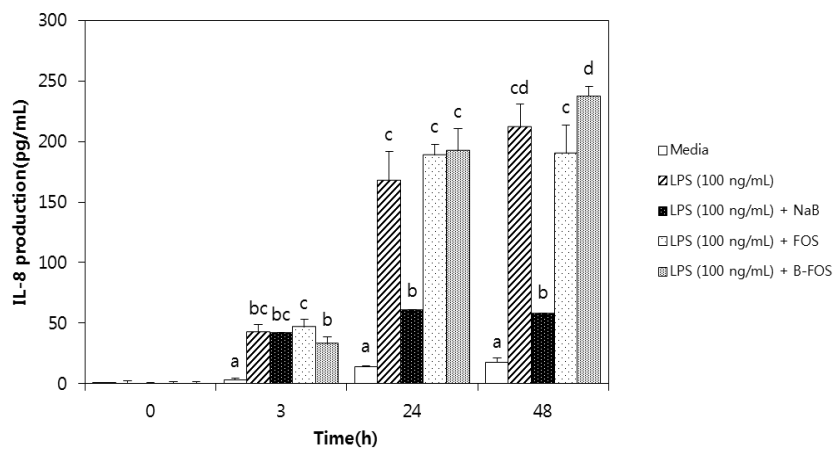


Fig. 13. The production of IL-8 from HT-29 cells cultured in media containing 0.1% (w/v) NaB, FOS, and B-FOS

Data are expressed as means \pm SD for n=3. One-way ANOVA was used to determine the statistical differences followed by Duncan' s test ($P < 0.05$).

4.10 AGS 세포의 B-FOS 이용 여부 확인

Glu+pyr+배지와 Glu-pyr- 배지에 FOS와 B-FOS를 첨가하여 AGS 세포를 4일 동안 배양 한 후 배양액을 TLC로 분석한 결과는 Fig. 14에 나타냈으며 배양 전후 밴드의 차이가 없는 것을 확인하였다. 따라서 B-FOS는 대장 상피 세포인 Caco-2 세포와 다르게 위의 상피세포인 AGS 세포에 의해서는 분해되거나 이용되지 않는 것으로 보인다.

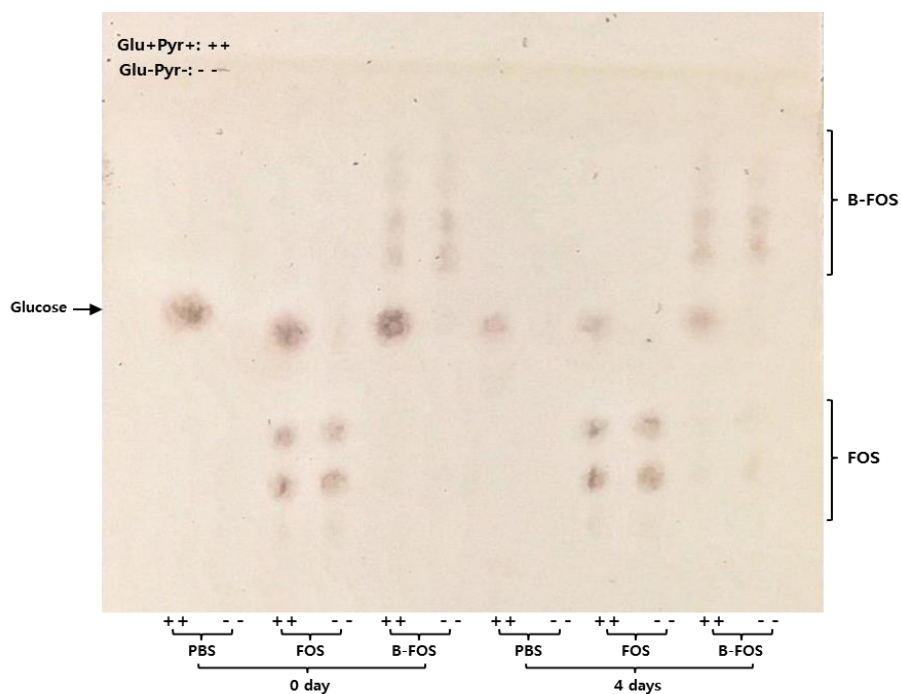


Fig. 14. TLC analysis of the culture supernatant of AGS cells cultured in media containing FOS and B-FOS

‘Glu+Pyr+(++)’ and ‘Glu-Pyr-(--)’ represent media containing glucose and pyruvate and media without them, respectively.

5. 고찰

본 연구에서는 부티릴 프락토올리고당(butyryl-fructooligosaccharides, B-FOS)을 탄소원이 없는 brain-heart Infusion broth(BHIB)에 첨가하여 장내 세균을 배양했을 때, B-FOS가 다수의 비피도박테리아와 일부 젖산균의 생장을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 또한, B-FOS를 탄소원이 없는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에 첨가하여 Caco-2 세포를 배양했을 때, Caco-2 세포의 증식을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 일정시간마다 장내 세균 배양액의 흡광도 값을 측정한 결과 B-FOS가 존재할 때, 유익균 다수의 최대 OD₆₀₀ 값은 탄소원이 없는 대조군에 비해 유의적으로 높았고 프로바이오틱스 균이 아닌 균주(non-probiotics)는 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 또한, 프락토올리고당(fructo-oligosaccharides, FOS)은 실험에 사용된 대다수의 균 생장을 촉진한 반면 B-FOS는 유해균을 포함한 non-probiotic 균주보다 유익균에 의해 더 잘 이용되었다. 이는 배양 전 후 상등액에 존재하는 B-FOS와 대사산물의 분석을 통해서도 확인할 수 있었다. Caco-2 세포의 경우 B-FOS가 첨가된 배지에서 4일 동안 배양 한 결과 세포 수가 유의적으로 증가하였다. B-FOS는 포도당과 피루브산이 존재하지 않는 조건에서 더 잘 이용되었는데 이는 배양 전후 상등액에 존재하는 B-FOS의 분석을 통해 확인할 수 있었다.

장내 미생물 대부분은 탄수화물을 발효함으로써 에너지를 얻는 혐기성 균이며 발효 산물로 유기산을 생성한다 [45]. FOS는 사람의 위와 소장에서 소화되지 않기 때문에 대장에 도달하여 장내 미생물에 의해 이용될 수 있는 올리고당(oligosaccharides)으로 장내에서 비피도박테리아와 락토바실러스의 특정 기질로써 이용된다고 알려져 있다 [46]. 하지만, 그 외의 장내 세균 또한 FOS에 의해 성장률이 증가되며 FOS를 대사하는 데 필요한 운반체(transporter)와 효소인 글리코시다아제(glycosidase)의 생성에 관여하는 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌다 [21, 47]. 이는 본 연구에서

탄소원이 없는 배지에 FOS를 첨가하여 장내 세균의 생장을 비교하였을 때 대다수 균이 잘 성장했던 결과와 일치하며 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 유의적으로 높았으므로 대부분의 장내 세균에 의해 잘 이용되는 것으로 판단된다. 한편, B-FOS는 신규 합성물질로 장내 세균에 의한 이용이 아직 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서 B-FOS가 첨가된 배지에서 배양된 장내 세균의 최대 OD₆₀₀ 값을 비교하였으며 그 결과, 다수의 유익균의 생장은 대조군에 비해 유의적으로 촉진됐지만, 그 외의 대다수 균은 생장에 유의적인 수준으로 영향을 받지 않음을 보였다.

이러한 양상을 나타내는 장내 세균이 B-FOS를 분해 및 발효하여 에너지원으로서 소비하였는지 분석하였다. 발효는 장내 미생물의 대사 작용의 결과로, FOS는 장내 세균에 의해 분해되어 젖산, 초산 등과 같은 유기산으로 발효된다 [48, 49]. 본 연구에서는, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 *Bifidobacterium longum* BORI가, 생장에 유의적인 차이가 없었던 *Enterococcus faecalis*보다 B-FOS를 상대적으로 더 잘 이용했음을 확인할 수 있었다. 또한, B-FOS에 의해 생장이 촉진됐던 균주의 배양 상등액에서 젖산, 초산, 부티르산을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 장내 세균은 B-FOS를 대사할 수 있으며, 분해하고 발효함으로써 에너지를 얻어 성장할 수 있음을 유추할 수 있었다.

균에 의한 B-FOS의 가수분해를 좀 더 확인하기 위해 B-FOS를 직접 균체, 균 배양 상등액, 균 파쇄액과 반응시켜보았다. 그 결과, B-FOS가 균체 또는 균 파쇄액과 반응했을 때 FOS와 부티르산이 생성되었다. 따라서 B-FOS를 가수분해하는 요인은 균체의 세포벽 혹은 세포 내에 있는 것으로 사료된다. 선행 연구에 의하면 FOS가 균에 의해 대사되는 분자적인 기전(mechanism)은 아직 완전하게 규명되지는 않았으나 ATP 결합상자 수송체(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) 혹은 phosphotransferase system(PTS)를 통해 세균의 세포 내로 수송된 후

세포질에서 β -1,2 결합을 분해하는 효소인 β -fructofuranosidase 에 가수분해되어 과당과 포도당-6-인산이 생성된다고 보고되었다 [50-53]. 본 연구에서는 B-FOS의 가수분해가 균체 내로 수송된 후 진행된 것인지 아닌지에 관한 기전은 알 수 없다. 하지만, B-FOS가 첨가된 배지에서 균을 배양했을 때, 배양 상등액에서 FOS가 확인 되지 않았던 결과를 통해서 B-FOS의 분해 결과 생성된 FOS는 균이 이용 하였을 것으로 생각된다. 따라서 B-FOS로부터 생성된 FOS와 부티르산이 균의 생장에 영향을 미쳤을 가능성을 제시 할 수 있다. 선행 연구에 의하면, 부티르산은 pH가 4.5와 5.0인 환경에서 *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* 균의 생장을 저해하며, 이는 배지에서 이온화하지 않은 부티르산이 세포로 확산되어 세포질의 산성화를 초래하고 세포 내에서 부티르산의 재이온화로 생성되는 양성자로 인해 ATP 합성을 저해함으로써 균의 생장이 억제된 것으로 추정되었다 [25]. 질병을 일으키는 유해균은 낮은 pH에대한 저항성이 강하지 않으므로, 산성화를 초래하는 부티르산은 유해균의 생장을 저해할 수 있다 [54]. 하지만, 프로바이오틱 균주는 낮은 pH에 저항할 수 있기 때문에 [55] 부티르산에 의한 생장의 저해가 유해균에 비해 나타나지 않을 수 있다. 그러므로 본 연구에서 B-FOS가 첨가되었을 때 non-probiotic 균주에 비해 비피도박테리아와 젖산균의 생장이 촉진된 결과에는 B-FOS로부터 분해된 FOS와 부티르산이 기인했을 것으로 사료된다. 비피도박테리아는 짧은 올리고당을 세포 내로 효율적으로 흡수(uptake)하는데 특화되어있어 우선적인 올리고당 대사를 나타내며 세포 외에서 탄수화물을 분해하는 다른 균들에 비해 경쟁적인 이점을 가진다고 보고된 바 있다 [14]. 따라서 장내균이 경쟁적인 환경에 있을 때 혹은 생체 내(*in vivo*)에서 무리 형태로 존재 할 때, B-FOS나 FOS를 특정 기질로 삼는 균의 존재는 장내 균의 생장에 본 연구와는 다른 영향을 미칠 수 있다. 그러므로, 추후 이에 관련한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

부티르산은 장 상피세포의 증식을 촉진하는 효과가 있으며 정상적인 대장 상피세포에서 산화 가능한 연료로서, 선호되는 주요 에너지원으로 잘 알려져 있다 [56-58]. 하지만 B-FOS가 대장세포에서 에너지원으로써 이용되는지는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 대장 상피 세포인 Caco-2 세포를 이용하여 NaB, FOS, B-FOS가 장 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 대장암 세포주에서 부티르산은 히스톤 탈아세틸효소(histone deacetylase, HDAC)를 억제하고 과아세틸화(hyperacetylation)를 발생시켜 세포의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도한다고 보고되었다 [59]. 하지만, 이는 대체 가능한 에너지원의 존재에 따라 달라지는데, 높은 농도의 포도당(4.5 g/L)과 피루브산이 존재할 때 부티르산은 세포 내에 축적되어 세포사멸을 유도하지만 포도당과 피루브산이 존재하지 않는 조건에서는 낮은 농도의 부티르산은 에너지원으로 이용되어 Caco-2 세포의 성장을 촉진한다는 결과가 관찰된 바 있다 [38]. 이는 본 연구에서 NaB를 첨가한 군의 결과와도 일치하였다. 하지만, B-FOS는 NaB와 달리 세포 수를 감소시키는 현상은 보이지 않았으며, 0.06%(w/v)의 농도에서 세포 수를 유의적으로 증가시켰다. 이는 B-FOS가 Caco-2 세포의 에너지원으로써 이용되어 장 상피세포의 증식을 촉진했음을 의미한다.

대체 가능한 에너지원의 존재에 따른 Caco-2 세포의 B-FOS 이용 여부를 좀 더 확인하기 위해 배양 상등액의 B-FOS를 분석하였다. 그 결과, 대체 가능한 에너지원이 없을 때 Caco-2 세포에 의해 B-FOS가 상대적으로 더 잘 이용되었으며 더 많은 양의 FOS로 전환된 것을 확인할 수 있었다. Caco-2 세포에 의한 B-FOS의 분해 경로를 확인하기 위해 B-FOS를 직접 Caco-2 세포의 배양 상등액, 세포 파쇄액, 세포 현탁액과 각각 반응시켰다. 그 결과, Caco-2 세포는 군과 달리 B-FOS의 분해에 관여하는 요인이 세포벽 혹은 세포내, 외에 있음을 유추할 수 있었다. 또한, 분해 결과 FOS와 부티르산이 생성되었다. B-FOS가 첨가된 배지에서

Caco-2 세포를 배양했을 때 부티르산이 검출되지 않았던 결과와 비교하여 보면, 배양 시 분해된 부티르산은 배양 과정에서 세포에 의해 이용된 것으로 사료된다.

MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 분석 결과, B-FOS를 처리했을 때 Caco-2 세포의 생존율은 포도당과 피루브산이 존재하는 조건에서 세포 수를 측정했던 결과와 비슷한 양상을 보였다. 또한, B-FOS는 72 시간까지 0.1%(w/v)의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다. 이러한 시간과 농도 조건을 토대로, B-FOS가 Caco-2 세포의 장벽 기능(intestinal barrier) 및 항염증반응에 미치는 영향을 살펴 보았다. 치밀이음부(tight junction)가 잘 유지되면 점막이 단단하게 부착되어 있어 세포와 세포 사이로 흐르는 전류가 세포 사이를 통과할 때 큰 저항을 발생시키기 때문에 세포 단층의 전기 저항값(trans-epithelial electrical resistance, TEER) 값이 높게 나타난다 [60]. 부티르산은 Caco-2 세포에서 TEER 값의 증가를 촉진 시키며 장벽의 기능(intestinal barrier)을 개선한다고 알려져 있다 [40, 61]. 본 연구에서 NaB의 처리는 이러한 선행 연구와 일치하는 결과를 보였다. 하지만, B-FOS와 FOS는 투과 장벽의 역할을 하는 장점막 세포의 치밀이음부(tight junction)의 온전성(integrity)에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 한편, 부티르산은 세포의 장벽 기능을 개선할 뿐만 아니라, 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)과 같은 사이토카인(cytokine)의 유전자 발현을 감소시키는 NF- κ B의 저해를 통해 항염증 효과를 나타낸다 [62]. 또한, 부티르산과 같은 단쇄지방산이 IL-8 생성에 미치는 영향은 잘 알려져 있다 [63, 64]. 선행 연구에서 부티르산은 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)로 자극한 사람의 장 상피세포에서 IL-8의 생성과 mRNA의 발현을 조절하며, IL-8의 하향 조절에 의해 장내 항염증반응에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 [43]. 본 연구에서 NaB의 처리는 선행 연구에서 나타난 바와 같이 LPS로 유도된 Caco-2 세포에서 IL-8의 생성량을 감소시킴으

로써 항염증반응을 나타낸 것으로 사료된다. 하지만, FOS와 B-FOS의 처리는 대조군과 유의적인 차이가 없었으며 IL-8의 발현 조절을 통한 항염증의 반응조절에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 본 연구의 Caco-2 세포를 이용한 실험에서는 B-FOS의 분해가 Caco-2 세포에 의해서만 발생했음을 고려해 볼 수 있다. 하지만, 사람의 장내 생태계는 대장 상피세포 뿐만 아니라 10^{13} - 10^{14} 의 장내 미생물 무리 등과 같은 요소로 구성되어 복잡한 환경을 나타낸다 [62]. 따라서 사람의 대장에서는 본 연구 결과 확인된 장내 균에 의한 B-FOS의 분해 또한 함께 발생할 가능성이 있다. 그러므로 대장에서 B-FOS의 분해 정도와 그에 따라 생성된 부티르산의 농도가 본 연구와 다를 수 있음을 예상할 수 있다. 이에 따라 생체 내(*in vivo*)에서 장 상피세포의 장벽 기능과 항염증 기능에 미치는 B-FOS의 영향과 관련된 추후 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

6 명의 건강한 지원자에게 11 일 동안 FOS를 섭취하게 한 결과 89%가 위와 소장에서 물질대사 되지 않고 대변으로 배출되지 않았으며, 이는 FOS가 대장의 미생물군에 의하여 완전히 발효된 것을 의미한다 [65]. 또한, FOS는 그 양에 비례하여 프리바이오틱스 효과를 나타낸다고 보고되었다 [16]. 본 연구는 생체 외(*in vitro*) 실험으로서 B-FOS가 산성조건(pH 2-4)에서 분해되지 않고 위장 상피 세포인 AGS 세포에 의해서 분해되거나 이용되지 않음을 확인하였지만, 사람의 위장관에서 B-FOS의 소화 및 흡수 여부는 아직 연구되지 않은 상태이다. 장 상피세포는 장 내장의 미생물과 장내 조직 사이의 장벽을 이루고 있으며 장내 미생물 무리는 장점막 표면에 정착하여 점막 조직과 직접적인 접촉을 하고 있다 [66, 67]. 따라서 만일 섭취된 B-FOS가 사람의 소화 효소에 의해 분해되지 않고 모두 대장에 도달한다고 가정했을 때, B-FOS는 장내 세균에 먼저 접촉하여 분해될 가능성을 제시해 볼 수 있다. 하지만, 본 연구에서 B-FOS는 Caco-2 세포 외에서도 분해 될 수 있음을 확인하였으므로 장 점막에 접촉한 B-FOS 또한 분해 될 것이라 생각된다. 결과적으로는, 장내 세균과 장 상

피 세포 모두에 의해서 B-FOS가 분해될 것이라고 예상할 수 있다. 또한, 장내에서 B-FOS의 분해 정도는 장관의 길이와 장관 내 위치하고 있는 미생물무리의 종에 따라 차이가 있을 수 있다. 그러므로 생체 내(*in vivo*)에서 B-FOS의 대사에 따라 나타나는 인체에 미치는 영향에 관하여 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

6. 요약 및 결론

본 연구는 탄소원이 없는 배양 배지에 부티릴 프락토올리고당(butryl-fructooligosaccharides, B-FOS)을 첨가하여 장내 세균 및 Caco-2 세포를 각각 배양한 후 장내 세균과 Caco-2 세포에 의한 B-FOS 이용 여부를 살펴보았다. 또한 탄소원이 없는 대조군, NaB가 첨가된 군, FOS가 첨가된 군을 B-FOS가 첨가된 군과 비교하여 장내 세균과 Caco-2 세포의 성장에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 주요 결과를 요약해보면 다음과 같다.

- 1) B-FOS가 존재할 때 균 배양액의 최대 OD₆₀₀값은 비피도박테리아와 젖산균을 포함하는 14 개의 균주 중 4 개의 비피도박테리아와 3 개의 젖산균 균주에서 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 특히, *B. bifidum* BGN4와 *B. longum* BORI, *L. casei*, *S. thermophilus*의 생장은 약 2-5 배로 높았다. Non-probiotics는 10 개 중 6 개의 균주가 대조군과 유의적인 차이가 없었다. 또한, *S. aureus*와 *C. butyricum*은 NaB가 존재할 때 최대 OD₆₀₀ 값이 대조군에 비해 각각 0.3 배, 0.14 배 유의적으로 낮았다.
- 2) 균의 배양 상등액에 존재하는 B-FOS는 *E. faecalis*에 비해 *B. longum* BORI 에서 소비되었음을 보였고, *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, *B. catenulatum*, *L. casei*에서 B-FOS의 대사산물로서 젖산, 초산, 부티르산이 검출되었다.
- 3) 0.06%(w/v)의 B-FOS가 첨가된 배지에서 배양된 Caco-2 세포의 수는 대조군에 비해 약 1.5-1.7 배 유의적으로 높았다. 0.06%(w/v)의 NaB가 첨가된 군의 경우 세포 수가 약 0.3 배 유의적으로 낮았으며 FOS가 첨가된 군에서는 유의적인 차이가 없었다.
- 4) Caco-2 세포의 배양 상등액에 존재하는 B-FOS는 포도당과 피루브

산이 존재할 때에 비해 존재하지 않았을 때 더 잘 이용됐음을 보였고, 배양 결과 FOS가 생성되었다. 하지만 AGS 세포의 배양 결과에서는 B-FOS의 이용과 FOS의 생성이 확인되지 않았다.

- 5) B-FOS의 분해는 균의 경우 균체의 세포벽과 세포 내에서, Caco-2 세포는 세포벽, 세포 내, 외에서 발생했으며 분해 결과 FOS와 부티르산이 생성되었다.

이상의 결과를 통해 신규 합성물질인 B-FOS는 유익균의 성장을 촉진하며 유익균에 의해 소비되어 대사산물로서 젖산, 초산, 부티르산을 생성함을 확인할 수 있었다. 반면, 유해균을 포함한 non-probiotic 균주의 성장에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. B-FOS는 균체의 세포벽 혹은 세포 내에서 분해되어 FOS와 부티르산을 생성하는데 이에 따라 생성된 FOS와 부티르산은 세균의 성장을 저해하거나 촉진하는데 영향을 미쳤음을 유추할 수 있었다. 또한, B-FOS는 Caco-2 세포의 증식을 촉진하며, 이는 B-FOS가 Caco-2 세포의 세포벽 혹은 세포 내, 외에서 분해되어 FOS와 부티르산을 생성하고 생성된 부티르산이 Caco-2 세포의 에너지원으로 사용되었음을 유추할 수 있었다.

7. 참고문헌

1. Kim JM: Roles of enteric microbial composition and metabolism in health and diseases. *Korean Journal of Gastroenterology* 2013, **62**:191–205.
2. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley E: Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology and Motility* 2013, **25**:4–15.
3. Myers SP: The causes of intestinal dysbiosis: a review. *A Journal of Clinical Therapeutics* 2004, **9**:180–197.
4. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E: Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 2017, **17**:219–232.
5. Olesen SW, Alm EJ: Dysbiosis is not an answer. *Nature Microbiology* 2016, **1**:16228.
6. Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F: Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: a review. *Journal of Functional Foods* 2016, **25**:511–522.
7. Hotel ACP, Cordoba A: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention* 2001, **5**:37–50.
8. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR: Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, **8**:692–700.
9. Kang CH, Kim YG, Han SH, Jeong Y, Paek NS: Antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria from korean intestine origin. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 2017, **32**:153–159.
10. Collins MD, Gibson GR: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1999, **69**:1052–1057.
11. Salminen S, Von Wright A (Eds.): Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. *CRC Press* 2004.
12. Yoon JA, Shin KO: Studies on the function of lactic acid bacteria and related yeasts in probiotics: a review. *The Korean*

- Society of Food and Nutrition* 2017, **30**:395–404.
13. Lee SE: Effect of novel propionyl–fructooligosaccharides on growth of intestinal bacteria. *Graduate School of Seoul National University* 2017, 1–34.
 14. Riviere A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L: Bifidobacteria and butyrate–producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology* 2016, **7**:979.
 15. Takemura N, Ozawa K, Kimura N, Watanabe J, Sonoyama K: Inulin–type fructans stimulated the growth of exogenously administered *Lactobacillus plantarum* NO. 14 in the mouse gastrointestinal tract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2010, **74**:375–381.
 16. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourié B, Bornet F, Rambaud J–C: Short–chain fructo–oligosaccharide administration dose–dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. *The Journal of Nutrition* 1999, **129**:113–116.
 17. Mei G–Y, Carey CM, Tosh S, Kostrzynska M: Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology* 2011, **57**:857–865.
 18. Bruno–Barcena JM, Azcarate–Peril MA: Galacto–oligosaccharides and colorectal cancer: feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods* 2015, **12**:92–108.
 19. Le Blay G, Michel C, Blottière HM, Cherbut C: Prolonged intake of fructo–oligosaccharides induces a short–term elevation of lactic acid–producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *The Journal of Nutrition* 1999, **129**:2231–2235.
 20. Rao VA: The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research* 2001, **21**:843–848.
 21. Hartemink R, Van Laere K, Rombouts F: Growth of enterobacteria on fructo–oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 1997, **83**:367–374.
 22. Mikkelsen LL, Knudsen KEB, Jensen BB: In vitro fermentation of fructo–oligosaccharides and transgalacto–oligosaccharides by adapted and unadapted bacterial populations from the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 2004, **116**:225–238.
 23. Bovee–Oudenhoven I, Ten Bruggencate S, Lettink–Wissink M, Van der Meer R: Dietary fructo–oligosaccharides and lactulose

- inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of *Salmonella* in rats. *Journal of the British Society of Gastroenterology* 2003, **52**:1572–1578.
24. Załęski A, Banaszkiewicz A, Walkowiak J: Butyric acid in irritable bowel syndrome. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2013, **8**:350.
 25. Sun CQ, O'Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM: The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. *Chemico Biological Interactions* 1998, **113**:117–131.
 26. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost F, Brummer RJ: The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2008, **27**:104–119.
 27. Velázquez OC, Lederer HM, Rombeau JL: Butyrate and the colonocyte. *Digestive Diseases and Sciences* 1996, **41**:727–739.
 28. Borycka–Kiciak K, Banasiewicz T, Rydzewska G: Butyric acid—a well-known molecule revisited. *Przegląd Gastroenterologiczny* 2017, **12**:83.
 29. Carroll K: Digestibility of individual fatty acids in the rat. *Journal of Nutrition* 1958, **64**:399–410.
 30. Vernia P, Monteleone G, Grandinetti G, Villotti G, Di Giulio E, Frieri G, Marcheggiano A, Pallone F, Caprilli R, Torsoli A: Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2000, **45**:976–981.
 31. Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, d'Incà R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D: Topical butyrate improves efficacy of 5-ASA in refractory distal ulcerative colitis: results of a multicentre trial. *European Journal of Clinical Investigation* 2003, **33**:244–248.
 32. Banasiewicz T, Krokowicz Ł, Stojcev Z, Kaczmarek B.F, Kaczmarek E, Maik J, Marciniak R, Krokowicz P, Walkowiak J, Drews M: Microencapsulated sodium butyrate reduces the frequency of abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome. *Colorectal Disease* 2013, **15**:204–209.
 33. Deschner E, Ruperto J, Lupton J, Newmark H: Dietary butyrate (tributyryn) does not enhance AOM-induced colon

- tumorigenesis. *Cancer Letters* 1990, **52**:79–82.
34. Lee JM: Preparation of fucose-containing monosaccharides from *Undaria pinnatifida* sporophyll and synthesis of fucosylated oligosaccharide using *Bifidobacterium longum* RD47. *Graduate School of Seoul National University* 2015, 1–34.
 35. Hwang JE: Synthesis of fucosylated oligosaccharides using crude enzyme extracts from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD 47. *Graduate School of Seoul National University* 2014, 1–56.
 36. Vigsnaes LK, Nakai H, Hemmingsen L, Andersen JM, Lahtinen SJ, Rasmussen LE, Hachem MA, Petersen BO, Duus JØ, Meyer AS: In vitro growth of four individual human gut bacteria on oligosaccharides produced by chemoenzymatic synthesis. *Food and Function* 2013, **4**:784–793.
 37. Hoseinifar S, Mirvaghefi A, Amoozegar M, Merrifield D, Ringø E: In vitro selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 2017, **23**:111–118.
 38. Singh B, Halestrap AP, Paraskeva C: Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 1997, **18**:1265–1270.
 39. Dzierzewicz Z, Orchel A, Weglarz L, Latocha M, Wilczok T: Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco-2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochimica Polonica* 2001, **49**:211–220.
 40. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J: Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Journal of Pediatrics* 2007, **61**:37–41.
 41. Matter K, Balda MS: Functional analysis of tight junctions. *Methods* 2003, **30**:228–234.
 42. Eckmann L, Kagnoff M, Falco M: Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 1994, **82**:505.
 43. Asarat M, Vasiljevic T, Apostolopoulos V, Donkor O: Short-chain fatty acids regulate secretion of IL-8 from human intestinal epithelial cell lines in vitro. *Immunological Investigations* 2015, **44**:678–693.

44. Kim J, Shin E, Park H: Fructooligosaccharides decreased the ability of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 to adhere to co-cultures of human intestinal cell lines. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2015, **58**:45–52.
45. Miller TL, Wolin M: Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1979, **32**:164–172.
46. Sabater–Molina M, Larqué E, Torrella F, Zamora S: Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2009, **65**:315–328.
47. Mao B, Li D, Zhao J, Liu X, Gu Z, Chen YQ, Zhang H, Chen W: In vitro fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. *Food and Function* 2015, **6**:947–954.
48. Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S, Matteuzzi D: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**:6150–6158.
49. Bornet FR, Brouns F, Tashiro Y, Duvillier V: Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease* 2002, **34**:111–120.
50. de Mesquita ARC, da Mota Silveira LP, da Cruz Filho IJ, de Lima VF, da Mota Silveira Filho V, Araujo AA, da Silva TL, de Freitas Araújo K, da Silva Macedo L: Metabolism and physiology of lactobacilli: a review. *Journal of Environmental Analysis and Progress* 2017, **2**:115–124.
51. Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate–Peril MA, Altermann E: Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 2005, **29**:393–409.
52. Goh YJ, Lee J–H, Hutkins RW: Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**:5716–5724.
53. Chen C, Zhao G, Chen W, Guo B: Metabolism of fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST–III via differential gene transcription and alteration of cell membrane fluidity. *Applied and Environmental Microbiology* 2015, **81**:7697–7707.

54. Bergeim O, Hanszen A, Pincussen L, Weiss E: Relation of volatile fatty acids and hydrogen sulphide to the intestinal flora. *The Journal of Infectious Diseases* 1941, **69**:155–166.
55. Kaplan H, Hutkins RW: Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**:2682–2684.
56. Sakata T: Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition* 1987, **58**:95–103.
57. Roediger W: Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *British Society of Gastroenterology* 1980, **21**:793–798.
58. Hague A, Butt AJ, Paraskeva C: The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *Proceedings of the Nutrition Society* 2007, **55**:937–943.
59. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Glei M: Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009, **682**:39–53.
60. Lee SJ, Lee MJ, Jung JE, Kim HJ: In vitro profiling of bacterial influence and herbal applications of *Loniceræ* flos on the permeability of intestinal epithelial cells. *The Korean Society of Food and Nutrition* 2012, **41**:881–887.
61. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzman IR, Lin J: Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition* 2009, **139**:1619–1625.
62. Sossai P: Butyric acid: what is the future for this old substance? *Swiss Medical Weekly* 2012, **142**:13596.
63. Weber TE, Kerr BJ: Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, **113**:139–147.
64. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK: Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through

- coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infection and Immunity* 2003, **71**:3503–3511.
65. Molis C, Flourie B, Ouarne F, Gailing M-F, Lartigue S, Guibert A, Bornet F, Galmiche J: Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1996, **64**:324–328.
66. Bron PA, Van Baarlen P, Kleerebezem M: Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology* 2012, **10**:66–78.
67. Kim JM: Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. *The Korean Journal of Gastroenterology* 2010, **55**:4–18.

Abstract

Utilization of Butyryl-fructooligosaccharides by Intestinal Bacteria and Caco-2 Cell and The Effects of Butyryl-fructooligosaccharides on the Growth of Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells

Um Min Hee

Department of Food & Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Fructo-oligosaccharides(FOS) are widely used as health functional food ingredients. They stimulate the growth of bifidobacteria and lactobacillus and modify the composition of the intestinal microbiota. Butyric acid is a principal energy source of intestinal epithelial cells. It may improve the intestinal barrier function and exert anti-inflammatory activity. Recently, butyryl-fructooligosaccharides(B-FOS) were synthesized from FOS and butyric acid. This is the first study to show the hydrolysis and utilization of B-FOS for the growth of intestinal bacteria and Caco-2 cells. For this purpose, B-FOS were added to dextrose free brain-heart Infusion broth(BHIB) and Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) without glucose and pyruvate to culture bacteria and Caco-2 cells, respectively. The availabilities of B-FOS by various bacteria and Caco-2 cells were confirmed by thin layer chromatography(TLC) and high performance liquid chromatography(HPLC). The effects of B-FOS on the growth of bacteria and Caco-2 cells were evaluated by comparing groups each containing sodium butyrate(NaB), FOS, and phosphate buffer saline(PBS) (as a control) with group containing B-FOS. In addition, the integrity of tight junctions in Caco-2 cells was assessed by trans-epithelial electrical resistance(TEER) and the production of IL-8 in HT-29 cells stimulated by lipopolysaccharides(LPS) was measured using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). As a

result, B-FOS significantly increased the growth of the most of the bifidobacteria and some lactic acid bacteria (LAB). On the other hand, the growth of the most of the non-probiotics was similar to that of the control. It was confirmed that B-FOS was consumed by *Bifidobacterium longum* BORI, which showed the excellent growth in B-FOS medium. Moreover, the lactic acid, acetic acid, and butyric acid were detected in the culture media of *B. bifidum* BGN4, *B. longum* BORI, and *B. catenulatum* KCTC 3221. This suggests that B-FOS can be used as a good carbon source by beneficial bacteria. In Caco-2 cells, B-FOS were used well for the growth of Caco-2 cells and converted to FOS especially in the DMEM without glucose and pyruvate. The TEER value of Caco-2 cells and the amount of IL-8 in HT-29 cells stimulated by LPS were not affected by B-FOS. When B-FOS were directly reacted with each of culture supernatants, cell suspensions, and cell extracts of the experimental bacteria and of Caco-2 cells, FOS and butyric acid were detected in both the cell suspension and cell extract of the bacteria, whereas they were found in all of the culture supernatant, cell suspension, and cell extract of Caco-2 cells. However, after the incubation of bacteria in the B-FOS medium, the FOS were not detected. Also, butyric acid was not detected after the incubation of Caco-2 cells in the B-FOS medium. This suggests that the FOS and butyric acid can be used by bacteria and Caco-2 cells, respectively. It means that B-FOS can promote the intestinal bacterial growth and proliferation of Caco-2 cells. Taken altogether, this study suggests that B-FOS may play a role in the regulation of intestinal microbiota by promoting the selective growth of probiotics and contribute to the physiological functions of intestinal epithelial cells as an energy source.

Key words: Fructo-oligosaccharides, Butyric acid, Intestinal epithelial cell, Bacterial growth, Butyryl-fructooligosaccharide

Student number: 2016-21667